ACTA PHYSIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS
E. ERNST, B. ISSEKUTZ SEN., G. IVÁNOVICS, N. JANCSÓ,
K. LISSÁK, E. T. SZÖRÉNYI

REDIGIT
F. B. STRAUB

TOMUS IV. FASCICULI 1—2.

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BUDAPEST, 1953

ACTA PHYSIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA KÍSÉRLETES ORVOSTUDOMÁNYI KÖZLEMÉNYEI

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

Az *Acta Physiologica* orosz, francia, angol és német 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 04-878-111-48), külföld számára pedig

a »Kultúra« Könyv- és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál

(Budapest VI, Sztálin-út 21. Bankszámla 45-790-057-50-032 sz.), vagy külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

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

»*Acta Physiologica*« выходит в 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 в стране принимает Akadémiai Kiadó (Budapest, V., Alkotmány-utca 21. Текущий счёт № 04-878-111-48), а для заграницы Предприятие по внешней торговле книг и газет »*Kultúra*« (Budapest V., Sztálin-út 21. Текущий счёт № 45-790-057-50-032), или его заграничные представительства и уполномоченные.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ENZYMATISCHE SYNTHESE DER SÄUREAMID- UND PEPTIDBINDUNG

I. DIE ENZYMATISCHE SYNTHESE VON GLUTAMIN IN LUPINUS ALBUS

Von

G. DÉNES und ZS. GAZDA

MEDIZINISCH-CHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen : am 28. Juli 1952.)

Die enzymatische Synthese des Glutamins wurde zuerst von *Krebs* (1) an Nierenschnitten, an Hirnrindenschnitten und an der Netzhaut verschiedener Wirbeltiere untersucht. Später dehnte er und seine Mitarbeiter (2) diese Untersuchungen auch auf Taubenleberschnitte aus, doch führten seine Versuche hinsichtlich des Reaktionsmechanismus zu keiner befriedigenden Erklärung. *Leuthard* und *Bujard* (3) wiesen im Homogenisat von Rattenlebern und Meerschweinchenlebern die Synthese des Glutamins aus Glutaminsäure und Ammonia nach, was zur gleichen Zeit auch *Speck* (4) im Homogenisat von Taubenlebern gelang. Diese Verfasser heben dabei hervor, dass zu diesem Prozess die Gegenwart von Adenosintriphosphat (ATP) und von Magnesiumionen notwendig ist. Zu einem ähnlichen Resultat gelangte *Elliott* (5) bei seinen mit Schafhirnextrakt durchgeführten Versuchen. *Elliott* und *Gale* (6) wiesen das Enzym in Staphylococcus aureus nach. *Speck* (7, 8) isolierte das in der Taubenleber befindliche Enzym und erbrachte den Nachweis, dass es während der Synthese des Glutamins in stöchiometrischem Verhältnis ATP verbraucht. Ein ähnliches Ergebnis erhielt *Elliott* (9) mit einem aus Schafhirnrinde isolierten, glutaminsynthetisierenden Enzym. Er untersuchte u. a. die Verbreitung dieses Enzyms in verschiedenen Lebewesen und fand dabei, dass es auch in Pflanzen (Lupinus albus, Lupinus angustifolius) vorkommt. Das in Lupinus albus anzutreffende glutaminsynthetisierende Enzym wurde von *Dénes* (10) isoliert. Die Klärung des Wirkungsmechanismus dieses Enzyms soll nun das Thema der vorliegenden Abhandlung bilden.

Methodik

Verwendete Mittel : ATP wurde nach *Dounce* (11) aus Kaninchenmuskeln hergestellt. Das erhaltene Bariumsalz wurde in normaler Salzsäure gelöst, in stöchiometrischem Verhältnis mit Natriumsulfatlösung versetzt, und so in

Natriumsalz verwandelt. Nach Zentrifugieren wurde das pH der übriggebliebenen Flüssigkeit mit Natriumhydroxydlösung auf 6,8 eingestellt und das Gemenge auf —10°C gehalten. Anal.: $P_7 = 7{,}60\%$, $P_{total} = 11{,}6\%$ (auf Ba_2ATP bezogen).

Adenosindiphosphat (ADP) wurde nach dem Verfahren von *Bailey* präpariert (12). Anal.: $P_7 = 4{,}56\%$, $P_{total} = 8{,}80\%$ (auf $Ba_{1,5}$ ADP, $4H_2O$ bezogen).

l(+)-Glutaminsäure, Hydroxylaminhydrochlorid, Hydrazinsulfat waren im Handel erhältliche Präparate, die vor Gebrauch dreimal in Wasser umkristallisiert wurden. Die Lösungen wurden vor Verwendung neutralisiert.

d(—)-Glutaminsäure wurde aus der Kapselsubstanz von Bac. anthracis durch Hydrolyse mit Salzsäure nach *Pongor* (13) gewonnen. N-Karbobensoxyglutaminsäure wurde nach der Methode von *Bergman und Zervas* (14) hergestellt und N-Azetylglutaminsäure nach den Angaben von *Nicolet* (15) synthetisiert.

Für die Überlassung von Pteroylglutaminsäure sei hier Dr. O. *Clauder* der beste Dank ausgesprochen.

dl-Methioninsulfoxyd wurde nach dem Verfahren von *Toennies* und *Kolb* (16) präpariert.

Als Versuchsmaterial wurden bei gewöhnlicher Laboratoriumsbeleuchtung 5 bis 6 Tage lang auskeimende Lupinus albus-Samen verwendet. Die Samen wurden am 5.—6. Tage nach ihrer Keimung mechanisch in einem Mörser zerrieben und ihr Saft ausgepresst. Der Presssaft wurde 24 Stunden lang bei 0°C gegen 0,05 *M* Phosphatpuffer dialysiert, dessen pH 6,9 betrug. Das dialysierte Enzym wurde mit 0,2 *M* Azetatpuffer pH 5,2 von gleichem Volumen versetzt. Der ausgefällte Niederschlag wurde abzentrifugiert und entfernt. Das pH der übriggebliebenen Flüssigkeit wurde mit 0,2 *M* Essigsäure von 0°C auf 4,2 eingestellt. Der so entstehende Niederschlag wurde abzentrifugiert und dann mit einer 0,2 *M* Natriumhydrokarbonatlösung aufgelöst. Die in der Lösung befindlichen Trübungen wurden bei 0°C mit 7000 U/Min. abzentrifugiert. Das so erhaltene Material wurde dann 24 Stunden gegen ein Gemenge von 0,15 *M* Natriumchlorid, 0,005 *M* Natriumhydrokarbonat und 0,001 *M* Kobaltchlorid dialysiert. Danach wurde das pH mit 0,2 *M* Essigsäure auf 5,2 eingestellt, der entstandene Niederschlag abzentrifugiert und dann mit einer 0,2 *M* Natriumhydrokarbonatlösung aufgelöst.

Auf diese Weise gelang es, eine 9,5 fache Reinigung des Enzyms zu erzielen.

Die Stabilität des Enzyms sinkt im Laufe der Reinigung. Das so bereitete Enzym kann bei —10°C einen Monat lang aufbewahrt werden, bei 0° C verliert es jedoch nach einer Woche 20% seiner Aktivität.

Reaktionsgemisch: Zur Messung der Enzymaktivität wurde folgendes Gemisch als Standardreaktionsgemisch verwendet: 1 ml 0,33 *M* Succinatpuffer pH 6,5; 0,4 ml 0,5 *M* l(+)-Natriumglutamat; 0,4 ml 0,5 *M* neutralisiertes Hydroxylaminhydrochlorid. Wenn in den hier beschriebenen Versuchen Ammoniumchlorid an Stelle von Hydroxylaminhydrochlorid verwendet wurde, so wurde es in einer Konzentration von 150 μg NH_3-N benutzt); 0,4 ml 0,05 *M* Kobalt-

chlorid ; 0,4 ml 0,06 *M* ATP ; 0,5 ml Enzym ; Wasser ad 4 ml. Die Röhrchen wurden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionszeit betrug, wenn nicht anders angegeben, 120 Minuten. Nach dem Ablauf der Reaktionszeit wurde das Eiweiss aus dem Reaktionsgemisch mit einem gleichen Volumen 10%iger Essigsäure ausgefällt und die Reaktion abgestellt. Der Niederschlag wurde filtriert und dann wurden die Bestimmungen mit dem Filtrat durchgeführt. Das Reaktionsgemisch enthielt, wenn es nicht besonders bezeichnet war, 7,8 mg enzymhaltiges Eiweiss.

Bestimmungen : Die Hydroxamsäure wurde nach dem Verfahren von *Lipmann* und *Tuttle* (17) aus 4 ml mit Trichloressigsäure von Eiweiss gereinigtem Reaktionsgemisch bestimmt.

Die Bestimmung des Ammonias erfolgte aus 4 ml mit Trichloressigsäure von Eiweiss gereinigtem Reaktionsgemisch in der Weise, dass das pH des trichloressigsauren Filtrats auf 6,8 eingestellt und das Ammonia im *Parnass-Heller*schen Apparat abdestilliert wurde. Das im Destillat befindliche Ammonia wurde kalorimetrisch mittels der *Nessler*schen Reaktion bestimmt.

Die Bestimmung des Phosphats geschah mit der *Jendrassik*schen Modifikation (19) der Methode von *Fiske* und *Subbarow*.

Ergebnisse

Stöchiometrische Verhältnisse. Abb. 1 zeigt die Synthese des Glutamins auf die Wirkung des glutaminsynthetisierenden Enzyms von Lupinus albus in

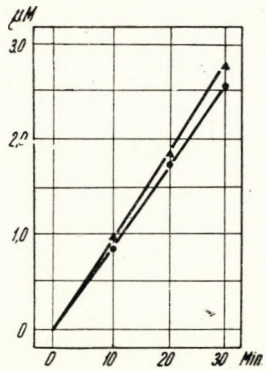


Abb. 1. Glutaminsynthese aus Glutaminsäure und Ammonia
— . — entstandenes Glutamin
—△— anorganisches Phosphat
Ordinate : entstandenes Glutamin und anorganisches Phosphat in μM
Abszisse : Zeit, Minuten

Gegenwart von ATP, l(+)-Glutaminsäure, Ammonia und Kobaltionen. Wenn nur eine dieser Komponenten fehlte, so erfolgte keine Amidsynthese.

Während der Synthese verschwindet freies Ammonia und vom ATP wird anorganisches Phosphat abgespaltet. Der Quotient der Phosphatabspaltung und der Amidsynthese beträgt 1,08. Wenn Hydroxylamin anstatt Ammonia verwendet wird, so kommt es zu einer Synthese von N-(γ-Glutamyl)-hydroxylamin. Der Umstand, dass bei der Synthese von Hydroxamsäure bei der Freiwerdung von 1,00 *M* anorganischem Phosphat eine Menge von N-(γ-Glutamyl)-hydroxylamin entsteht, die 1,13 M Succinylhydroxamsäure äquivalent ist, wird dadurch bedingt, dass der Succinylhydroxamsäure-Standard nicht dieselbe Farbe per *M* ergibt wie das N-(γ-Glutamyl)-hydroxylamin. Aus den Untersuchungen *Lipmanns* (17) ist bekannt, dass verschiedene Hydroxamsäuren, wie die Azetylhydroxamsäure und die Succinylhydroxamsäure, nicht dieselbe

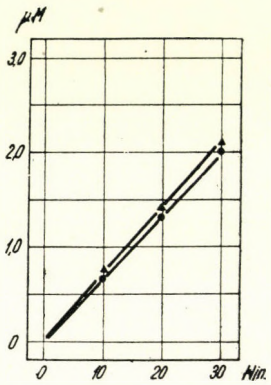


Abb. 2. Synthese der N-(γ Glutamyl)-hydroxylamin aus Glutaminsäure und Hydroxylamin
— . — entstandene Hydroxamsäure
—△— anorganisches Phosphat
Ordinate : entstandene Hydroxamsäure und anorganisches Phosphat in μM
Abszisse : Zeit, Minuten

Farbe per *M* geben. Wenn jedoch die Bestimmung der Hydroxamsäure mit N-(γ-Glutamyl)-hydroxylamin vorgenommen wurde, deren synthetische Herstellung nach der Methode von *Roper* und *McIlvain*'s (20) erfolgte, so wurde bei der Freisetzung von 1,00 *M* anorganischen Phosphats die Synthese von 0,96 *M* Hydroxamsäure erzielt (Abb. 2). Da also die stöchiometrischen Verhältnisse in diesem Falle mit den stöchiometrischen Verhältnissen der Glutaminsynthese übereinstimmen, wurden die weiteren Messungen mit Hilfe der Hydroxamsäurereaktion ausgeführt.

Die Isolierung des Glutamins. Es wurde mit einer grossen Menge von Enzym Versuche angestellt, um das durch dieses Enzym synthetisierte Glutamin zu isolieren und zu identifizieren. Das Gemisch enthielt 0,08 *M* Succinatpuffer, 0,005 *M* Kobaltchlorid, 0,05 *M* Glutaminsäure, 0,009 *M* ATP und 0,05 *M* Ammoniumchlorid. Das Reaktionsgemisch wurde mit 0,2 g gereinigter Myokinase sowie mit 50 ml des auf die beschriebene Weise präparierten glutaminsynthetisierenden Enzyms versetzt. Das Gesamtvolumen betrug 200 ml. Die Myokinase

wurde deshalb dem Gemisch zugegeben, damit sie das während der Glutaminsynthese entstandene ADP zu ATP und AP umgestalte. Das Reaktionsgemisch wurde 18 Stunden lang bei 30°C inkubiert, und zwar in Gegenwart von einigen Tropfen Toluol als Konservierungsmittel. Nach der Inkubation wurde das Glutamin nach dem Verfahren von *Vickery*, *Pucher* und *Clark* (21) isoliert. Das so gewonnene Material bestand aus farblosen Kristallen, die dann dreimal in wässerigem Äthanol umkristallisiert wurden. Auf diese Weise erhielt man 0,48 g Material.

Anal. $C_5H_{10}O_3N_2$; berechnetes N = 19,2 % säurelabiles N = 9,5 %,
gefundenes N = 19,12% « N = 9,42%.

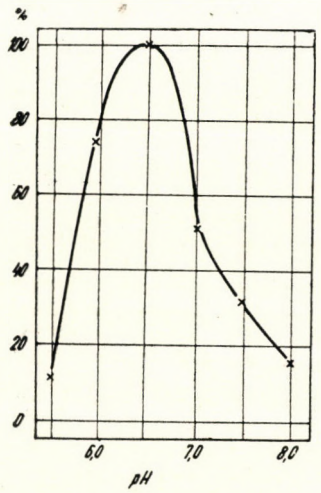


Abb. 3. Wirkung des pH auf die Amidsynthese. Zur Verwendung gelangte Phosphatpuffer, ausser bei den niedrigeren pH-Werten, wo Azetatpuffer angewandt wurde
Ordinate: die bei pH = 6,5 gemessene Aktivität in %
Abszisse: pH-Werte

Bei der papierchromatographischen Analyse zeigte sich auf dem Phenol-Wasser-Chromatogramm ein Fleck. Wenn das hiergewonnene Material mit dem nach der Methode von *Vickery* und Mitarbeitern (21) aus der Zuckerrübe isolierten Glutamin vermengt wurde, so ergab sich gleichfalls ein Fleck. Das Präparat war frei von Ammonia, bei der *Nessler*schen Reaktion verfärbte es sich nicht sofort, sondern die Farbe kam erst langsam zum Vorschein, wie dies auch aus der Literatur bekannt ist [*Archibald* (22)].

pH-Optimum. Wenn Hydroxylamin dem Reaktionsgemisch als Aminkomponente beigefügt wird, so wird Hydroxamsäure synthetisiert. Das optimale pH der Synthese beträgt 6,5. Das pH-Optimum liegt ebenfalls bei 6,5, wenn als Aminkomponente des Systems Ammonia genommen wird (Abb.3).

Glutamat. Auf Abb. 4 ist die Synthese der Hydroxamsäure bei verschiedenen Glutaminsäurekonzentrationen dargestellt. Für die maximale Aktivität ist eine Menge von 0,05 *M* l(+)-Glutaminsäure notwendig.

Bei der Untersuchung der Spezifizität des Enzyms stellte es sich heraus, dass es nicht imstande war, aus d(—)-Glutaminsäure, aus N-Karbobensoxyglutaminsäure, aus N-Azetylglutaminsäure, oder aus Pteroylglutaminsäure die entsprechende Hydroxamsäure zu synthetisieren. Dies weist darauf hin, dass zur Tätigkeit des Enzyms die Aminogruppe der Glutaminsäure frei zu sein hat.

Es wurden auch zahlreiche andere Karboxylsäuren untersucht, um festzustellen, ob sie die Glutaminsäure bei der Synthese der Hydroxamsäure zu ersetzen vermögen. Weder das ursprüngliche noch das gereinigte Enzym war jedoch imstande, aus diesen Verbindungen Hydroxamsäure zu synthetisieren.

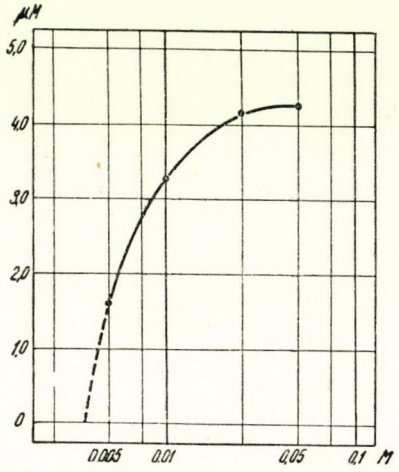


Abb. 4. Wirkung der Glutaminsäurekonzentration auf die Amidsynthese
Ordinate: entstandene Hydroxamsäure in μM
Abszisse: Glutaminsäurekonzentration in M

Zu diesen gehören die Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Brenztraubensäure, Oxalessigsäure, α-Ketoglutarsäure. Gleichfalls als inaktiv erwiesen sich einige andere untersuchte Aminosäuren, wie Glyzin, Alanin, Valin, Leuzin, Isoleuzin, Serin, Threonin, Zystein, Methionin, Asparginsäure, Histidin, Arginin, Lysin. Auch aus Nikotinsäure war das Enzym nicht imstande, die entsprechende Hydroxamsäure zu synthetisieren.

Amine. Verschiedene Amine vermögen in der Gegenwart von ATP mit Glutaminsäure eine Reaktion zu geben, wobei aus dem ATP organisches Phosphat frei wird. Ammonia, Hydroxylamin und Hydrazin gehören zu den Aminen, mit denen es gelang diese Reaktion nachzuweisen. Da das Enzym selbst keine ATPase-Aktivität aufweist, so tritt die in Abwesenheit von Amin erfolgende kleine Phosphaterhöhung deshalb auf, weil das Enzym selbst eine kleine Menge Ammonia enthält.

TABELLE I

System	Anorganisches Phosphat μM
Glutaminsäure ohne Amin	0,20
Glutaminsäure + Ammoniumchlorid ..	6,00
Glutaminsäure + Hydroxylamin	4,57
Glutaminsäure + Hydrazin	4,56

Im Reaktionsgemenge befindet sich 0,05 *M* Amin

Die nachstehenden Amine und Aminosäuren ergaben unter diesen Umständen ein negatives Resultat: Methylamin, Dimethylamin, Trimethylamin, Paraaminobenzoesäure, Glyzin, Alanin, Valin, Leurin, Isoleuzin, Serin, Threonin, Methionin, Asparaginsäure, Phenylalanin, Histidin, Arginin.

Adenosintriphosphat. Wie bereits erwähnt, kommt in der Abwesenheit von ATP keine Amidsynthese zustande. Abb. 5 zeigt die Synthese der Hydroxamsäure als Funktion der ATP-Konzentration.

Weder ADP noch AP vermögen ATP zu ersetzen. Sowohl ADP als auch AP hemmen die Amidsynthese in der Gegenwart von ATP. Die Hemmung hat einen kompetitiven Charakter.

TABELLE II

System	Hydroxamsäure-bildung μM	Entstehung von anorganischem Phosphat μM
Adenosin-5-monophosphat	0,00	0,20
Adenosindiphosphat	0,00	0,22
Adenosintriphosphat	3,85	4,24
ATP + AP	3,22	3,56
ATP + ADP	1,92	2,22

Die Endkonzentration der Nukleotiden ist 0,006 *M*

Aktivierung und Inhibitoren. Die Enzymaktivität von gereinigtem Lupinus albus ist in der Abwesenheit von Co^{++}-, Mg^{++}- oder Mn^{++}-Ionen gering.

Wie aus Abb. 6 ersichtlich, beträgt die optimale Konzentration der Kobaltionen 0,005 *M*, die der Magnesiumionen 0,01 *M*, wobei aber ihre aktivierende Wirkung kleiner ist als die der Kobaltionen. Manganionen üben in grosser Konzentration eine hemmende Wirkung aus.

Die Tätigkeit des glutaminsynthetisierenden Enzyms wird durch Natriumfluorid gehemmt. Diese Hemmung erreicht 55% in einer Konzentration von 0,01 *M*.

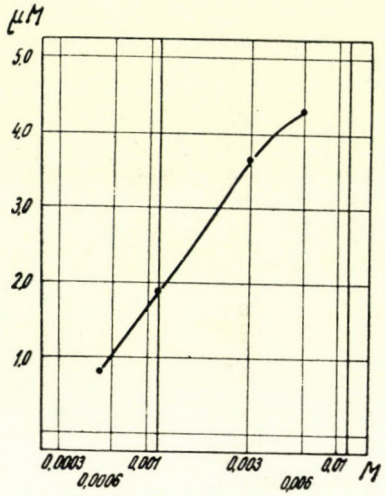


Abb. 5. Wirkung der ATP-Konzentration auf die Amidsynthese
Ordinate: entstandene Hydroxamsäure in μM
Abszisse: ATP-Konzentration in *M*

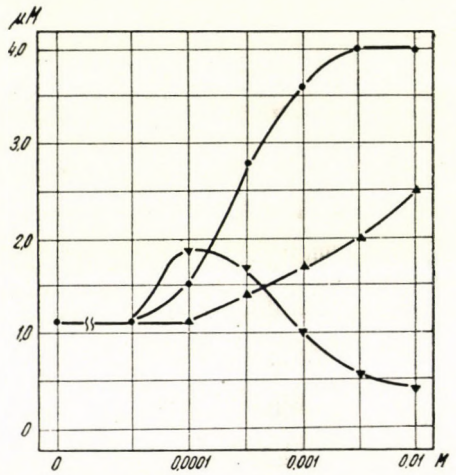


Abb. 6. Wirkung der Co^{++}-, Mg^{++}- und Mn^{++}-Ionen auf die Amidsynthese
Hydroxamsäuresynthese in Gegenwart
von Kobaltionen — . —
von Magnesiumionen — ▲ —
von Manganionen — ▼ —
Ordinate: entstandene Hydroxamsäure in μM
Abszisse: Ionenkonzentration in *M*

Waelsch (23) hatte die Beobachtung gemacht, dass Methioninsulfoxyd das Wachstum der Laktobazillen stark beeinträchtigt. Diese Hemmung konnte mit einer grossen Menge Glutaminsäure aufgehoben werden oder aber mit einer geringen Menge Glutamin, was den Schluss zuliess, das es sich hier um eine kompetitive Hemmung handelt. *McIlvain* und Mitarbeiter (24) wiesen nach, dass Methioninsulfoxyd die Glutaminsynthese von Streptokokken hemmt. *Elliott* und *Gale* (6) hatten den direkten Nachweis erbracht, dass Methioninsulfoxyd die auf die Glutaminsäure bezügliche Glutaminsynthese in Gegenwart von ATP und Ammonia in kompetitiver Weise hemmt. Wie aus Abb. 7 ersichtlich, wird auch die Tätigheit des aus Lupinus albus gewonnenen Enzyms durch Methioninsulfoxyd gehemmt.

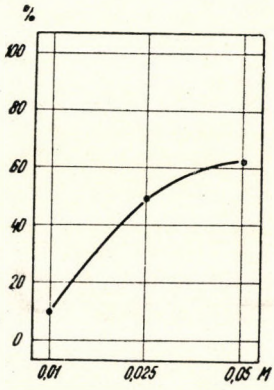


Abb. 7. Hemmung der Amidsynthese durch Methionsulfoxyd
Ordinate: Hemmung der Hydroxamsäuresynthese in %
Abszisse: Methionsulfoxydkonzentration in *M*

Mechanismus der Synthese. Bei der Glutaminsynthese in Gegenwart von Adenosintriphosphat und Ammonia muss mit der Entstehung von intermediären Verbindungen gerechnet werden. Solche Verbindungen können sein: γ-Glutamylphosphat, γ-Glutamyladenosintriphosphat, das nach der Reaktion mit Amin Amid gibt. Unter diesen Umständen bestehen hinsichtlich des Reaktionsmechanismus zwei Möglichkeiten. Die eine Möglichkeit besteht darin, dass das Enzym lediglich die Synthese des γ-Azylphosphats katalysiert, während der zweite Schritt durch eine nicht auf enzymatischem Wege erfolgende Zersetzung von gemischten Säureanhydryden in Gegenwart einer stickstoffhaltigen, basischen Verbindung erklärt werden könnte. Weder *Speck* (8) noch *Elliott* (9) gelang es jedoch, ein solches intermediäres Azylphosphat nachzuweisen. Die zweite Möglichkeit ist, dass beide Schritte durch das Enzym katalysiert werden. Da auch die Verfasser vorliegender Abhandlung nicht imstande waren, das

intermediäre Glutamylphosphat nachzuweisen, so stellten sie es synthetisch her (die diesbezügliche Methode wird später veröffentlicht werden). Das synthetische Glutaminsäure -γ-azylphosphat bringt — wie aus Tabelle III ersichtlich — auch ohne das Enzym mit Ammonia und Hydroxylamin eine Reaktion zustande, wobei Glutamin bzw. N-(γ-Glutamyl)-hydroxylamin entsteht. Die Reaktion selbst spielt sich innerhalb weniger Minuten ab.

TABELLE III

System	Hydroxamsäurebildung μM	Glutaminbildung μM
25 μM Glutaminsäure-γ-azylphosphat + 50 μM Hydroxylamin	24,2	—
25 μM Glutaminsäure-γ-azylphosphat + 50 μM Ammoniumchlorid	—	24,4

Der Umstand, dass es den erwähnten Verfassern nicht gelang, aus dem inkompletten enzymatischen Reaktionsgemisch (ohne Base) das intermediäre Azylphosphat nachzuweisen, dürfte wahrscheinlich darauf zurückzuführen sein, dass es sich nicht in einer Menge anhäuft, die mit der von ihnen angewandten Methode nachgewiesen werden konnte. Wenn aber die in der Literatur akzeptierte Ansicht aufrechterhalten wird, nämlich dass sich das γ-Azylphosphat intermediär bildet, und wenn weiters berücksichtigt wird, dass das synthetische Azylphosphat keine enzymatische Reaktion mit Amin ergibt, so scheint die Annahme auf der Hand zu liegen, dass die Enzymreaktion einstufig ist. In diesem Fall kann das Enzym als Phosphopherase aufgefasst werden.

Zusammenfassung

Aus keimendem Lupinus albus hergestelltes und gereinigtes glutaminsynthetisierendes Enzym katalysiert in stöchiometrischem Verhältnis die Synthese des Glutamins aus Glutaminsäure, Ammonia und ATP in Gegenwart von Kobaltionen, wobei es zu einer Bildung von ADP und anorganischem Phosphat kommt. In der vorliegenden Abhandlung wurden die Reinigung und die Eigenschaften des Enzyms untersucht.

In diesem System kann die l(+)-Glutaminsäure nicht durch eine andere Aminosäure ersetzt werden. Dagegen ist das Ammonia durch Hydroxylamin und Hydrazin ersetzbar. ADP und AP können nicht an Stelle von ATP verwendet werden. Die Kobaltionen sind durch Magnesium- oder Manganionen ersetzbar, wobei das Mangan in grosser Konzentration eine hemmende Wirkung ausübt.

Es ist für die Wirkung des glutaminsynthetisierenden Enzyms notwendig, dass die Aminogruppe der Glutaminsäure frei sei.

Die Synthese kann durch Fluorid und Methioninsulfoxyd gehemmt werden.

Das synthetische Glutaminsäure-γ-azylphosphat reagiert auf Ammonia und Hydroxalamin nicht enzymatisch, und es entsteht dabei Glutamin bzw. N-γ(-Glutamyl)-hydroxylamin.

Es darf daher mit grösster Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass die enzymatische Glutaminsynthese einstufig ist und dass die Tätigkeit des Enzyms als Phosphopherase zum Ausdruck kommt.

LITERATUR

1. *Krebs, H. A.:* Biochem. J. **29**, 1951, (1935).
2. *Örström, A., Örström, M., Krebs, H. A., Eggleston, L. V.:* Biochem. J. **33**, 995, (1939).
3. *Leuthardt, F., Bujard, E.:* Helv. Med. Acta **14**, 247, (1947).
4. *Speck, J. F.:* J. Biol. Chem. **168**, 403, (1947).
5. *Elliott, W. H.:* Nature, **161**, 128, (1948).
6. *Elliott, W. H., Gale, E. F.:* Nature **161**, 129, (1948).
7. *Speck, J. F.:* J. Biol. Chem. **179**, 1387, (1949).
8. *Speck, J. F.:* J. Biol. Chem. **179**, 1405, (1949).
9. *Elliott, W. H.:* Biochem. J. **49**, 106, (1950).
10. *Dénes, G.:* Experientia. Im Druck.
11. *Dounce, A. L., Rothenstein, A., Beyer, G. t., Meier, R., Freer, R. M.:* J. Biol. Chem. **174**, 361, (1948).
12. *Bailey, K.:* Biochem. J. **36**, 121, (1942).
13. *Pongor, G.:* Experientia **6**, 421, (1950).
14. *Bergmann, M., Zervas, L.:* Berichte **63**, 1193, (1932).
15. *Nicolet, B. H.:* J. Am. Chem. Soc. **52**, 1192, (1930).
16. *Toennies, E., Kolb, J. J.:* J. Biol. Chem. **128**, 399, (1939).
17. *Lipmann, F., Tuttle, L. C.:* J. Biol. Chem. **159**, 21, (1945).
18. *Krebs, H. A.:* Biochem. J. **43**, 51, (1948).
19. *Fiske, C. H., Subbarow, Y.:* J. Biol. Chem. **66**, 375, (1925).
20. *Roper, J. A., McIlvain, H.:* Biochem. J. **42**, 485, (1948).
21. *Vickery, H. B., Pucher, G. W., Clark, H. E.:* J. Biol. Chem. **109**, 39, (1936).
22. *Archibald, R. M.:* Chem. Rev. **37**, 161, (1945).
23. *Waelsch, H., Owades, P., Miller, H. K., Borek, E.:* J. Biol. Chem. **166**, 273, (1946).
24. *McIlvain, H., Ropre, J. A., Hughes, D. E.:* Biochem. J. **42**, 492, (1948).

ОБ ЭНЗИМАТИЧЕСКОМ СИНТЕЗЕ АМИДА КИСЛОТЫ И ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ

I. Энзиматический синтез глютамина в Lupinus Albus

Г. Денеш и Ж. Газда

Медицинско-химический институт медицинского университета, Будапешт

Резюме

Полученные из зародышевого Lupinus Albus и очищенные энзимы, синтезирующие глютамин, катализируют синтез глютамина, полученный из глютаминовой кислоты, из аммония и из АТФ, в присутствии ионов кобальта, причем возникает АДФ и неорганический фосфат. Очистка и свойства энзимов были исследованы.

В этой системе l(+) глютаминовая кислота не замещается другой аминокислотой. d(—) глютаминовая кислота является также неактивной. Аммоний заменим гидроксиламином и гидразином. АДФ и АФ не способны предоставить необходимую для реакции энергию. Co^{++} ион заменим Mg^{++} и Mn^{++} ионами. Последние тормозят при высокой концентрации.

Синтез можно тормозить флюоридом и метионинсульфоокисью.

Для действия энзимов, синтезирующих глютамин, необходимо, чтобы аминогруппа глютаминовой кислоты была свободной.

Синтетическая глютаминовая кислота — γ — ацилфосфат реагирует без энзимов аммонием и гидрокисламином, причем возникает глютамин, или же глютаминовая кислота-гидроксамовая кислота. Если во время реакции энзимов возникает глютаминовокислый ацилфосфат, — как это обычно предполагается, — то на основании вышеизложенного кажется вероятным, что для возникновения глютамина, или же для глютаминовой кислоты-гидроксамовой кислоты, уже не требуется действия энзимов. Возникновение глютамина, или же глютаминовой кислоты-гидроксамовой кислоты можно объяснить расщеплением смешанного ангидрида, происходящии в присутствии базы, содержащей азот. В этом случае энзимы, синтезирующие глютамин, можно рассматривать как фосфофераз.

CONTRIBUTIONS TO THE STRUCTURE OF ELASTIN WITH SPECIAL REFERENCE TO THE ACTION OF ELASTASE

By

I. BANGA AND D. SCHULER

I. DEPARTMENT OF PATHOLOGICAL ANATOMY AND EXPERIMENTAL CANCER RESEARCH, MEDICAL UNIVERSITY, BUDAPEST

(Received : 30, June 1952.)

Elastin belongs to the proteins responsible for the elasticity of the wall of vessels and of the skin. Advancing age is accompanied by disappearance of elastic fibres, and in arteriosclerosis the amount of elastin is similarly reduced. If we wish to understand properly how elastin disappears, all experiments concerned with the chemical structure of the enzyme are of great importance. Thus the enzymic breakdown of elastin and analysis of the split products permit insight into the structure of the substance.

So far only a very limited number of studies have dealt with the enzymic breakdown of scleroproteins of the animal organism. *Linderstrøm—Lang* and *Duspiva* (1) found in the gastro-intestinal tract of the clothes moth larvae an enzyme dissolving the keratine of wool. This proteolytic enzyme acts only in the presence of reducing substances such as cystein, thioglycolic acid, KCN, etc. Papain is also capable of hydrolyzing by proteolysis the so-called Michaelis' keratine (2) if this has previously been treated with a base in the presence of reducing substances. Up to now, no enzyme produced by the animal organism has been known to be capable of hydrolyzing the scleroprotein of the body. Elastase, produced by the animal organism and capable of breaking down animal scleroprotein, would be the first enzyme of that kind.

Since elastase is available in pure form, (3) the means of studying the mode of action of elastolysis are given.

As pointed out by *Banga* in a previous paper (4), the dissolution of elastin (elastolysis) is not a simple process of proteolysis, i. e. not merely a disruption of polypeptide bonds transforming elastin from the fibrous form into the globular one. It was also stated that the dissolution product which we call elastolysate (E. L.) of elastin is a substance of protein nature the major part of which is precipitated by trichloracetic acid.

The present paper offers new data on the chemically definable molecules split off in the course of elastolysis and permits insight into the chemical structure of elastin.

Methods

1. *Preparation of elastolysate (E. L.) obtained in the course of elastolysis*

Elastin prepared from the aorta of cattle (3) was made to be dissolved — unless stated otherwise — by our purest preparation of elastase (F. P. 0,3 to 0,4). (3) 20 to 22 mg of elastin were usually dissolved in 2,5 volumes of water containing 2 ml of N/10 pH 10,3 carbonate-HCl buffer and 1 to 2 mg of elastase, at a temperature of 37° C. The time required for dissolution and the duration of incubation varied in different experiments and will be dealt with later. Following dissolution, the liquid in the tubes was centrifuged and the supernatant elastolysate decanted. The amount of protein dissolved was determined following digestion by *Kjeldahl's* method and by the method previously described (3). This E. L. the amount of which was measured in mg or gamma protein became the object of analyses.

2. Acetone titration of amino groups was carried out according to *Linderstrøm—Lang*, with naphtyl red as an indicator. (5)

3. Alcohol titration of carboxyl groups was performed according to *Willstätter* and *Waldschmidt—Leitz* (6) with N/50 alcoholic sodium hydroxide and using thymol blue as an indicator. Alcoholic NaOH was freshly prepared in each case and discarded as soon as the solution became turbid.

4. Titration of carboxyl groups was, in certain cases, also carried out by the formaldehyde method of *Sörensen* (7).

5. One-dimensional ascending chromatography of E. L. was carried out according to *Szára* (8), using phenol as a solvent.

6. Nitroprusside reagent for the demonstration of sulphhydril groups of E. L. 5 g of nitroprusside sodium were dissolved in 100 ml of saturated ammonium sulphate. To 0,2 ml of this solution 0,1 ml of concentrated NH_4OH was added before use. The volume of 0,3 ml was used to 0,8 ml of E. L., containing 6 to 8 mg of protein.

7. Dye decolouration reactions were carried out in *Thunberg* tubes, under anaerobic conditions. As a control, similar amounts of both elastin and elastase were submitted to the reaction and the results compared to those obtained with E. L. Evaluation was, however, rendered difficult by the fact that the dye became adsorbed to the insoluble elastin. Therefore, when no change in colour occurred within a short time, the experiment has not been evaluated.

8. Fe^{+++} reduction method for demonstrating reducing groups of E. L. The method was based on reduction of ferrichloride by the reducing groups present in the protein. Ferro ions thus produced form with the $\alpha\alpha'$-dipyridil present a red complex that can be subjected to colorimetry by comparing it to a known ferro solution. Determinations were carried out in the following way. To 2,5 ml of E. L. prepared as described under 1., as well as to the control

tubes containing both elastin and elastase, 1 ml of M acetic acid, 0,8 ml of N/100 ferrichloride, and after mixing, 1 ml = 2 mg of a *aa'* dipyridil solution were added. The volume of fluid in the tubes was 5,3 ml. The tubes were incubated in a water bath at 37° C for 20 minutes. Following incubation, volumes were made up to 10 ml with distilled water. After centrifuging, readings were taken in a Dubosq colorimeter against a known solution of ferroammonium sulphate.

Preparation of the ferroammonium sulphate standard. Before each test, a fresh solution of N/1000 $Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ was prepared. Of this, 1 ml, 0,5 ml, 0,25 ml and 0,1 ml amounts were diluted to 10 ml with a mixture containing all the solvents used in the experiments, i. e. 2 ml of N/10 pH 10,3 buffer, 1 ml of M acetic acid, 1 ml = 2 mg of *aa'* dipyridil, and 0,8 ml of N/1000 $FeCl_3$, made up to 10 ml. In several cases, the $FeCl_3$ was omitted from the standard because values obtained this way were easier to evaluate, although the colour of the solution to be tested and that of the ferro standard were not perfectly identical.

9. 2,6 dichloro-phenol-indophenol reduction according to *Todrick* and *Walker* (9).

10. Hypoiodide titration of sugaraldehydes. Deproteinization was performed according to *Fujita* and *Iwataka*, with $CdSO_4$+NaOH. To the deproteinized solution 2 ml of N/50 iodine solution (diluted from an N/10 iodine solution containing 6 per cent of KJ) and 0,2 ml of 5 per cent Na_2CO_3 were added. After allowing the mixture to stand at 20° C for 30 minutes, 1 ml of N/2 H_2SO_4 was added and the iodine not used up titrated with N/200 thiosulphate in the presence of starch. Simultaneously, a blank containing the precipitating solutions without the substance to be tested was also set up. The difference in titers allowed to calculate the quantity of aldose, each ml of n/200 thiosulphate equalling 0,45 mg of glucose.

Results

Liberation of NH_2 and COOH groups in the course of elastolysis

20 to 22 mg of elastin were dissolved with incubation of varying duration in 2,5 ml volumes in the presence of elastase. Depending upon the duration of incubation, varying amounts of elastin went into solution, thus different amounts of E. L. were contained in 1 ml. The aim of the experiments was to determine whether or not the number of titratable NH_2 or COOH groups increased with the amount of elastin dissolved : in other words, is the ratio NH_2 and COOH per 1 mg of E. L. a constant one.

In part of the experiments, after the complete dissolution of elastin, the tubes were allowed to stand at 37° C in order to find out whether the number of NH_2 or COOH groups would increase following dissolution, i. e. to what a degree is dissolution connected with proteolysis. Dissolved elastin was expressed

in terms of N/50 equivalent, representing the number of ml of NaOH needed in the determination of total nitrogen. The N/50 equivalents of NH_2 and COOH respectively, also represent the amount in ml of the titrated base or acid. Table I. contains the results of 3 series of experiments, in which elastases of approximately equal purity originating from three different preparations were used (3).

TABLE I

Correlation of NH_2 and COOH groups arising in the course of elastolysis with the amount of E. L.

Incub. min.	Designation of experiment	mg E. L. per ml (mg protein)	N/50 equivalent per ml					
			E. L.	NH_2	COOH Willst.	COOH formole	NH_2 / E. L.	COOH / E. L
15	E. $L._4$	5,1	2,96	0,10	—	0,05	—	—
	E. $L._5$	7,2	4,30	0,63	0,53	0,35	0,14	0,12
	E. $L._7$	9,3	5,55	0,78	0,53	0,40	0,14	0,09
60	E. $L._4$	7,5	4,43	0,82	—	0,20	0,18	—
	E. $L._5$	9,8	5,80	1,05	0,65	0,50	0,18	0,11
	E. $L._7$	9,3	5,55	1,00	0,63	0,55	0,18	0,11
360	E. $L._4$	11,2	6,6	1,34	—	0,41	0,20	—
	E. $L._5$	9,8	5,8	1,60	0,72	0,65	0,27	0,12
	E. $L._7$	9,3	5,55	1,53	0,65	0,60	0,27	0,12
1440	E. $L._4$	11,2	6,6	2,35	—	0,72	0,35	0,11
	E. $L._5$	9,8	5,8	2,05	0,93	0,72	0,35	0,16
	E. $L._7$	9,3	5,55	1,88	0,70	0,70	0,34	0,13

The results indicate that, together with the increase in the amount of E. L., the quantity of both NH_2 and COOH also increased. The amount of NH_2 always surpassed that of COOH, the former having often been twice to three times as much as that of the latter. Proteolysis was found to have continued after the complete dissolution of elastin, suggesting that although there might exist a correlation between dissolution and proteolysis, the two processes are not terminated at the same time. Proteolysis following dissolution is a slow process, as it can be seen from Fig. 1. in which the results of experiment E. $L._4$ are shown. Fig. 1. clearly demonstrates that the number of NH_2 groups increased with the progress of elastin dissolution. Following complete dissolution the process is continued at a very limited pace. The curve indicates distinctly that the number of COOH groups is extremely small in comparison to the number of NH_2 groups.

In another series of experiments the amount of NH_2 and COOH was studied after equal amounts of elastin had been dissolved in the presence of elastase preparations of different purity. As shown in Table II., regardless of the purity of the elastase preparation, NH_2 per E. L. values were approximately identical in experiments carried out with four different substances containing various amounts of Elastolytic Units (E. U.). This means that the number of NH_2 groups liberated depends chiefly on the amount of dissolved elastin.

The quantity of non-protein nitrogen, i. e. the nitrogen obtained from E. L. by means of distillation according to *Kjeldahl* was markedly reduced in comparison to values yielded by the acetone titration method

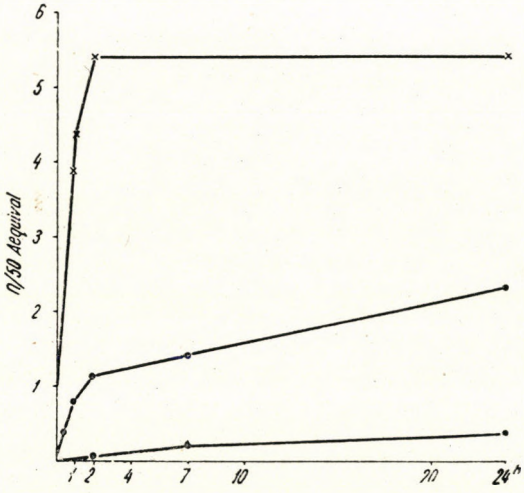


Fig. 1. NH_2 and COOH groups liberated in the course of elastolysis. Experiment E. $L._4$: x-x-x- dissolved elastin, o-o-o- NH_2 groups liberated in the course of dissolution, titrated by the method of Linderstrom—Lang. o-o-o- COOH groups liberated in the course of dissolution, titrated according to Willstätter and Waldschmidt—Leitz.

of *Linderstrøm—Lang* which method does not require previous precipitation of proteins, titration being carried out directly in the reaction mixture. The first column of Table III, showing the results of four

TABLE II

NH_2 and COOH groups liberated in the presence of elastase preparations of different purity

Designation of elastase preparation	E. U. / mg	Duration of incub. in min.	mg E. L. as protein	N/50 equivalent per ml		
				E. L.	NH_2	NH_2 / E. L.
S. P. 0,3—0,5	4	190	8,3	4,96	0,90	0,18
A. L. 0,2—0,4	8	105	8,8	5,25	0,88	0,17
T. P. 0,2—0,4	14	50	8,6	5,15	0,98	0,19
F. P. 0,3—0,4	20	35	8,4	5,05	0,95	0,19

experiments performed with the method of *Linderstrøm—Lang* not preceded by protein precipitation, indicates that E. L. contains amino groups. These amino groups, however, do not originate from amino acids, as, following precipitation, they could not be determined in the form of nonprotein nitrogen by *Kjeldahl's* method. For precipitating protein, the following substances were used. Trichloro-acetic acid in a final concentration of 15 per cent : protein precipitating agents employed in sugar determination, alkaline $ZnSO_4$ *(Hagedorn—Jensen)* or alkaline $CdSO_4$ *(Fujita* and *Iwataka)*. The deproteinized filtrate contained only about one-fifth the amount of NH_2 groups determinable with the acetone titration method of *Linderstrøm—Lang*. This suggests that in E. L. the majority of amino groups detectable by the method of *Linderstrøm—Lang* is bound to polypeptides and amino acids are not titrated at all in that method.

TABLE III

Determination of NH_2 groups of E. L. by the Linderstrøm—Lang titration and by Kjeldahl's estimation of non protein nitrogen

No of experiments	N/50 equivalent/ml	
	NH_2 Linderstrøm—Lang	Non-Protein-Nitrogen Kjeldahl
1	1,00	0,24
2	1,05	0,26
3	0,85	0,20
4	0,92	0,25

Chromatographic examination of E. L. yielded in the course of elastolysis

Since, as suggested by the results just discussed, the amino groups determined with the method of *Linderstrøm—Lang* do not originate from amino acids but from polypeptides, experiments were made with one-dimensional ascending paper-chromatography, a more sensitive method of amino acid determination.

Elastin, being a fibrous, insoluble protein, does not give a paper-chromatogramme. On the other hand, amino acids produced from elastin by means of HCl hydrolysis are demonstrable by chromatography. In one experiment, E. L., when tested by this procedure, yielded four distinct spots with the following RF values : 0,18—0,20 ; 0,41—0,43 ; 0,55—0,59 ; and 0,81—0,83. As a solvent, phenol was used. The values obtained are similar to those given by aspartic acid, glycine, alanine and leucine. Since the spots do not appear if the E. L. used has been deproteinized with trichloro-acetic acid, it is obvious that the spots represent polypeptides.

Analysis of reducing groups produced in the course of elastolysis

It could be demonstrated by iron reduction tests that reducing groups are liberated in the course of elastin dissolution. It remained to be determined whether the groups liberated in the course of dissolution were SH groups or reducing groups of another type. Another question was whether the reducing groups remained bound to elastin also after its dissolution, as experienced in the case of amino acids, or else, the reducing groups would be detectable in the form of small-molecule compounds in the deproteinized filtrate as well. Therefore, the problem has been approached in several ways, using the nitroprusside reaction, decolouration tests with dyes of a known redox potential, *Fehling's* and orcin tests for demonstrating sugar aldehydes, and, as a quantitative method, hypoiodide titration.

E. L., in a concentration of 8 to 10 mg of protein per ml, develops with the nitroprusside reagent a slight reddish blue appearing only in the presence of KCN. Since elastase contains an SH—SS group system corresponding to 0,5 — 0,6 per cent cystein HCl and since the nitroprusside reaction is not a quantitative one, careful experiments using very reliable controls could only lead to the result that if the groups arising during dissolution were SH ones, then their amount would not exceed 0,01 to 0,02 per cent SH, as calculated in terms of cysteine HCl.

For demonstrating reducing groups in E. L., the decolouration reaction with known redox dyes was also used. In Table IV., the intensity of decolouration is indicated by crosses. Three crosses represent a decolouration of about 80 per cent, two crosses one of about 50 per cent, one cross one of 25 to 30 per cent. According to *Fruton* and *Clarke* (10), the redox potential of the cystin-cysteine system at pH 10 was found to be —0,35.

TABLE IV

Decolouration reaction of E. L. with dyes of known redox potential

Dye	Eh pH 7,15	Eh pH 10	Decolourization pH 10
Toluidine blue	+ 0,115	—	++
Brilliantcresyl blue....	+ 0,040	—	+++
Methylene blue	+ 0,011	— 0,08	++
Nile blue	— 0,140	—	+
Gallophenin	— 0,229	— 0,320	+

The most negative redox dye used by us was gallophenine (E_h—0,32) and even this dye was decolourized by E. L. Unfortunately, a redox dye of a

more negative potential was not available and from this aspect the experiment has not been completed. Nevertheless, it was still of decisive significance, inasmuch as the redox potential of the reducing system in E. L. was found to be less than —0,32. In the case of gallophenine, reduction is irreversible because blue reduced gallophenine does not regain its original colour even when shaken in the presence of air.

According to *Todrick* and *Walker*, 2,4-dichlorophenol-indophenol (D. P. I.) is decolsurized at 100° C by the SH groups of proteins. The reaction is a quantitative one as the amount of SH groups in the protein can be estimated from the amount of dye decolourized. In order to clear what kind of reducing groups E. L. contained, this reaction was also performed, determinating the reduction of elastin, elastin+elastase (without dissolution), and of E. L. In this connection the interesting observation was made that while elastin alone markedly reduced the dye at 100° C, it did not produce this reaction in the presence of elastase. However, after elastin had been dissolved by elastase, the reaction could be observed again. This suggests that the reducing groups in elastin are bound by elastase and are therefore not capable of reducing the dye. When dissolution has been completed, the binding ceases and the reducing groups become free to react with the dye. It has also been learned from the experiments that a close correlation exists between the amount of elastase and that of the dye, and that it is this correlation that determines the degree of decolourization. When the dye preponderates, decolouration develops within certain limits, because the dye is capable of pushing off the active groups of elastase from the reducing groups of elastin. When, with the same concentration of the dye, there is a preponderance in elastase, no decolouration will occur, because the reducing groups of elastin are bound by the elastase and the former cannot reduce the dye. This accounts for the fact that a smaller quantity of dye is reduced by a certain amount of dissolved elastin than by the same amount of undissolved substance, the dye being oxidized by the elastase required for dissolution. The results obtained are shown in Table V.

TABLE V

Dichloro-phenol-indophenol (D. P. I.) reduction of E. L.

Substance tested in 2,5 ml	Decoloured ml D. P. I. 10 min. 100° C
60 γ Cystein—HCl	0,6
21 mg elastin	0,6
21 mg elastin + 1 mg elastase (without dissolution)	0
21 mg elastin + 1 mg elastase (after dissolution)	0,4
1 mg elastase	0

For quantitative determination of reducing groups in E. L., iron reduction tests were used. The amount of ferro ions produced from $FeCl_3$ was measured with dipyridil. Table VI. contains the results of four experiments. Reduction values of control elastin and those of elastase have been substracted from the values tabulated. The amount of E. L. per ml, that of the Fe^{+++} reduced by it (in gamma). and that of the resulting Fe^{++} per 1 mg of E. L., are also shown in the Table,

TABLE VI

Fe reduction of E. L. within 20 minutes

No of experiment	mg E. L. per ml	γ red. Fe^{++} per ml	γ red. Fe^{++} per mg O. T.
1	8,4	16,8	2,0
2	8,8	16,8	1,90
3	8,65	17,5	2,02
4	8,5	16,5	1,94
		Mean : ..	1,96 γ

The mean of four experiments indicates that 1 mg of dissolved elastin is capable of reducing 1,96 gamma of Fe^{+++} within 20 minutes. As it has been found later, this value was valid as far as the rate of reaction was concerned, but was not suitable for the determination of the absolute amount of reducing groups. If the tubes are incubated for a period longer than 20 minutes, then the amount of iron reduced by 1 mg of elastin will show a continuous increase with time. Values obtained after 24 hours surpass 4 to 5 times those found after 20 minutes. Consequently, although the method is not suitable for quantitative determination of reducing groups contained in elastin, it nevertheless proves that, as shown in Fig. 2., simultaneously with the dissolution of elastin, liberation of reducing groups also proceeds.

Reactions for demonstrating reducing groups of sugars indicated that the reducing groups liberated from E. L. may be aldo- or ketohexoses. Positive reactions were yielded by both Fehling's and the orcin tests. By means of blood sugar determination according to *Hagedorn—Jensen* and hypoiodide titration, the quantity of reducing groups contained in E. L. could be satisfactorily determined. The reducing groups could be demonstrated also following the precipitation of protein. It seems, therefore, that following elastolysis the group containing sugaraldehydes is not any longer bound to protein, i. e. has been split off from the protein molecule in the course of dissolution. Table VII. shows the carbohydrate content of solutions deproteinized by the method of *Fujita* and *Iwataka*. The E. L. used in this experiment had been produced with the purest elastase which latter contained 4 per cent of the amount of reducing

substances. By means of elastase two types of elastin, that of *Stein* and *Miller* and that of *Banga* (11, resp. 3) were made to dissolve. The amount of elastase, equalling 10 per cent of the quantity of elastin dissolved, was not taken into consideration when values in the Table were calculated. It can be seen from Table VII. that a suspension of elastin, when freshly prepared, does not contain reducing groups following protein precipitation. On the other hand, if the suspension is allowed to stand in a pH 10,3, N/10 Na_2CO_3—HCl buffer for a longer period (10 to 20 days), part of the reducing substances are slowly brought into solution and become demonstrable. By means of hypoiodide titration

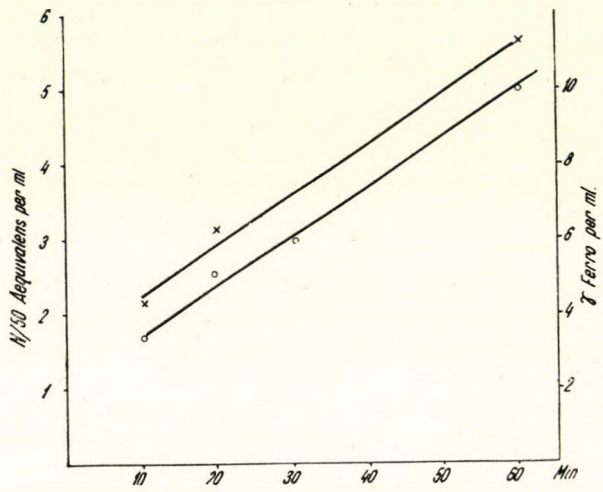


Fig. 2. Reducing groups liberated in the course of elastolysis.
x-x-x- Dissolved elastin expressed in terms of N/50 equivalent.
o-o-o- Reducing groups demonstrable in the dissolved elastin expressed in terms of γ Fe^{++}

without previous precipitation of protein, 3,1 per cent of the carbohydrates (presumably sugar) become demonstrable. This means that the reducing groups of elastin are oxidized by the iodide and may, at least in part, be determined even without elastolytic dissolution. Thus it seems that the reducing carbohydrate molecules of elastin are bound to protein and are split off from the polypeptide chain in the course of elastolysis.

TABLE VII

Hypoiodide titration of sugaraldehyde split off in the course of elastolysis

Substance tested	N/200 Thiosulphate	mg glucose	% carbohydrate
4 mg Stein and Miller (S. M.) elastin.....	0	0	0
4 mg Banga elastin (B) fresh susp.	0	0	0
4 mg Banga elastin (B) old susp.	0,28	0,125	3,1
4,1 mg E. L. S. M.	1,15	0,516	12,5
6,7 mg E. L. B.	1,67	0,751	11,2
3,3 mg E. L. B.	0,9	0,40	12,2

Discussion

While elastin, built up from long fibrous molecules, is transformed by elastolysis into a globular protein, three types of molecule groups become demonstrable, viz. amino, carbohydrate and acid groups. The measured quantity of amino groups amounts to about one-third one-fourth of the quantity of amino groups contained in the protein molecule. The majority of amino groups remains bound to protein and it is only a small part that can be found in the deproteinized filtrate. On the other hand, the substance, supposed to be a sugar aldehyde is split off from the protein. It seems that it is the splitting of the glycosidic linkage to protein of the carbohydrate molecule which is responsible for the transformation of fibrous elastin into globular elastin, as it might be assumed that the fibrous structure develops in consequence of the fact that protein units built up solely from amino acids are being connected by polysaccharide or by sugar ester molecules. According to hypoiodide titrations, in the fibrous substance carbohydrate molecules amount to 10 to 12 per cent, this being the number falling to one protein unit (17,600). The acid group was determined as carboxyl. This means that in the Tables I. II. figures for COOH might include also some other acid group, such as sulphate ions. In other experiments, as well as in histological examinations of the wall of bloodvessels, it has been found that during elastolysis a mucoidlike substance takes the place of elastin. It is characteristic of mucoids to contain carbohydrates in the form of sulphate esters, sugar being usually present in the form of galactosamine or glycosamine. A small part of the amino groups appears also in the deproteinized filtrate. This fact, however, does not suffice to corroborate the supposition suggested by our calculations i. e. that the substance formed would be a hexoseamine. As to the acid groups, further investigations are needed to determine the exact proportion of carboxyl and SO_4 ions present.

The 2,6 dichlorophenol-indophenol (D. P. I.) reaction carried out at 100° C and used for determining the SH groups of protein as well as the decolourization reactions of several dyes led us astray in the beginning. Then, after *Schiff*'s reaction (following phosphotungstic acid hydrolysis) had been introduced among our histological methods (unpublished data), it soon became clear that the process in question was a carbohydrate reaction. Experiments carried out with D. P. I. remain, however, of interest, as by their means it could be proved that elastase binds the reducing groups of elastin. Owing to this, in the presence of elastase dyes are rendered incapable of acting on elastin even at 100° C. Following dissolution of elastin, the linkage is broken up. The phenomenon, that in this case only part of the added dye is being reduced, is attributable to the fact that a certain amount had been re-oxidized by the elastase.

The investigations discussed allow some insight into the structure of elastin. Up to now elastin was considered a protein built up solely from amino

acids. The carbohydrate group split off in the course of elastolysis indicates, however, that elastin is a glucoprotein and that it is the participation of carbohydrate in the molecule to which the fibrous character of elastin is due.

Summary

1. In the course of elastolysis, amino and acid groups bound to polypeptides become demonstrable from elastin. No amino acid liberation occurs when fibrous elastin is being enzymatically transformed into globular elastin.

2. In the course of elastolysis, a reducing group, probably a carbohydrate, is split off from elastin. The appearance of the group is in close correlation with the transformation of fibrous protein into the globular form. From this it has been concluded that elastin is a glucoprotein, the fibrous character of which is determined by the carbohydrate group built into the molecule.

3. In the course of elastolysis, the carbohydrate molecule of elastin becomes bound to elastase. Following dissolution, the carbohydrate molecule can be demonstrated in the deproteinized filtrate.

LITERATURE

1. *Linderstrom-Lang, K.* and *Duspiva, F.:* Z. f. phys. Chem. **237,** 131 (1935).
2. *Goddard, D. R.* and *Michaelis, L.:* J. biol. Chem. **106,** 605 (1934).
3. *Banga, I.:* Acta Physiol. Hung. **3,** 317 (1952)
4. *Banga, I.:* Z. f. Vit. Horm. u. Form. Forsch. **4,** 49 (1951).
5. *Linderstrom-Lang, K.:* Z. phys. Chem. **173,** 32 (1927).
6. *Willstätter, R.* and *Waldschmidt—Leitz E.:* Ber. dtsch. Chem. Ges. **54,** 2988 (1921).
7. *Sörensen:* Biochem. Z. **25,** 1 (1910).
8. *Szára, I.:* Kísérletes Orvostudomány **3,** 71 (1951).
9. *Todrick, A.* and *Walker, E.:* Bioch. J. **31,** 292 (1936).
10. *Fruton, S.* and *Clark, H. T.:* J. biol. Chem. **106,** 667 (1934).
11. *Stein, W. H.* and *Miller, E. G.:* J. biol. Chem. **125,** 599 (1938).

ДАННЫЕ К СТРУКТУРЕ ЭЛАСТИНА НА ОСНОВЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ЭЛАСТАЗЫ

И. Банга и Д. Шулер

Патологоанатомический и экспериментальный ракоисследовательский институт № 1. медицинского университета, Будапешт

Резюме

1. Во время эластолиза можно выявить из эластина амино- и кислотную группу, связанную к полипептидам. Энзиматическое превращение фиброзного эластина в глобулярный эластин не сопровождено освобождением аминокислоты.

2. Во время эластолиза отщепляется от эластина восстановительная молекула сахара, появление которой тесно связано с превращением фиброзных белковых тел в глобулярную форму. Из этого можно заключить, что эластин является глюкопротеидом, фиброзный характер которого определяется именно застроенной в молекуле группой углевода.

3. Во время эластолиза эластаз связывает углеводную молекулу эластина, после растворения можно эту углеводную молекулу выявить в лишенном от белковых тел фильтрате.

EFFECT OF ANTIHISTAMINE SUBSTANCES ON BRAIN RESPIRATION

By

J. DOMONKOS and I. HUSZÁK

INSTITUTE OF BRAIN RESEARCH OF THE MEDICAL UNIVERSITY, SZEGED

(Received: 2, August 1952)

Investigating the pathochemistry of neuroallergic reactions, we have studied the action of biogenic amines, especially that of histamine, considering the central rôle which it plays in the mechanism of allergic processes. It was examined whether, beside its well-known biological effects, histamine accumulated under pathological conditions influenced the metabolism of the central nervous system, and whether it had a part in the decomposition of the medullary sheath in neuroallergic reactions. The effect on metabolism of the central nervous system was studied by using antihistamines, the pharmacological antagonists of histamine.

It has been established (1, 2) that respiration of the gray matter of the central nervous system is inhibited by antihistamines, whereas respiration of the white substance and of the muscles are not influenced. Beside the gray matter, the liver and the kidney are the only organs the respiration of which is influenced by antihistamines, this effect being, however, only slight. In the gray matter, respiratory inhibition brought about by antihistamines may be compensated with histamine, methylene blue, or boiled, protein-free muscle extracts. Applying the Thunberg test and investigating the velocity of hydrogen activation with methylene blue as a hydrogen acceptor, no inhibition is caused by antihistamines which exert no significant influence on cytochrome oxydase either. By means of spectroscopic examination of the reduction and oxydation of cytochromes in a surviving homogenate of gray matter, it could be established that antihistamines inhibit the reduction of cytochromes without exerting an effect on their reoxidation.

While antihistamines do not influence the respiration of intact muscle, the reduction of cytochromes is equally inhibited both in washed muscle in the presence of an H-donator (succinate) and in unwashed slices of gray matter. Examining the effect of different redox dyes, only methylene blue proved capable of counteracting the respiratory inhibition produced by antihistamines. Other, more positive, dyes such as 2—6 dichlorophenol-indophenol or 1-naphtol 2-sodiumsulphonate-indophenol are either ineffective or relieve the respiratory inhibition only slightly (1, 2).

This suggests that the antihistamines inhibit respiration by affecting the heavy metal catalysts which bind one of the cytochromes. The inhibition may be relieved by histamine and muscle extracts which contain imidazol compounds (carnosine, histamine) in considerable quantity.

The next problem consisted in determining the member of the cytochrome chain in which the histamine-antihistamine antagonistic effect takes place, and to gain insight into the chemical mechanism of complex formation. First it was examined whether antihistamines and histamine are capable of forming complexes with purified cytochrome-c.

Cytochrome-c dissolved in a pH 7,38 phosphate buffer (cytochrome-c, 0,00005 M; phosphate buffer, 0,0666 M) was added to a 5 equimolar solution

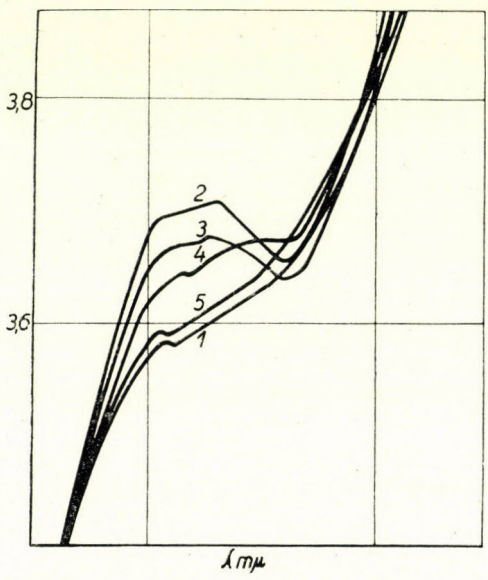


Fig. 1

1. Haematin
2. Pyribenzamine-parahaematin
3. Neoantergane-parahaematin
4. Antistine-parahaematin
5. Histamine-parahaematin

of histamine resp. antihistamine (pyribenzamine, neoantergane, or antistine). The solutions were then examined in a *Beckmann* spectrophotometer.

As the presence of the substances did not influence the spectrum of cytochrome, it has been concluded that they do not form complexes with cytochrome-c.

As similarly exact determinations cannot be carried out on insoluble cytochrome components, the only possibility was to examine whether anti-

histamines do or do not form complexes with haemin, the prosthetic group of haemin-protein. Investigation into this problem seemed the more indicated as antihistamines belong to the nitrogen bases which, as has been shown by *Langenbeck* (4) and *Stern* (3), readily form complexes with haemins.

The antihistamines neoantergane, pyribenzamine and antistine were examined. Pure haemin-chloride was used and suspended in alkaline medium (0,00005 M). The haematin-complexes were prepared with twice the equimolar amount of antihistamine in a phosphate buffered medium (pH 7,38 ; 0,0666 M) and examined in a *Beckmann* spectrophotometer.

As can be seen from Curve I, the antihistamines formed characteristic complexes with haematin.

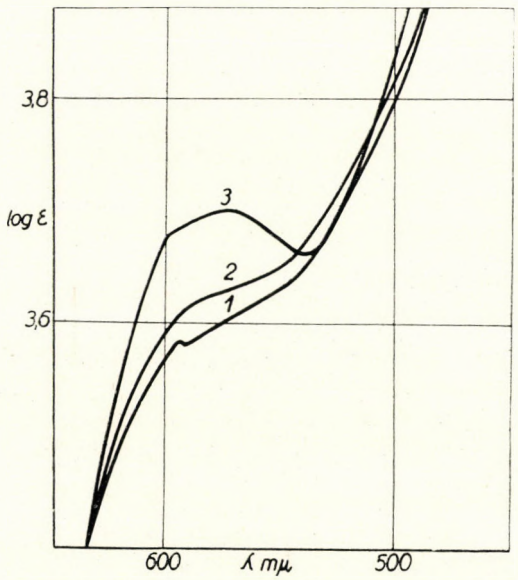


Fig. 2

1. Haematin
2. Pyribenzamine-parahaematin + histamine
3. Histamine-parahaematin + pyribenzamine

The absorption curve of the histamine-parahaematin complex, developed after preparation by means of the method mentioned above, is shown in Fig. I.

It follows from the experiments that both histamine and antihistamines easily form complexes with haematin.

As already mentioned, respiratory inhibition produced in surviving organs by antihistamines can be compensated by addition of histamine. Consequently, if complex formation occurs in the prosthetic group of haemin-protein, the antihistamine of the antihistamine-haemin complex must equally be substi-

tutable with histamine. The »exchange antagonism« of histamine and antihistamine in the haematin-complex may be proved by spectroscopic examination.

For examining the exchange antagonism, five times the amount of equimolar histamine and antihistamine, respectively, was used for a given complex. As a solvent, a pH 7,38 phosphate buffer (0,0666 M) was used.

As can be seen from Fig. II., antihistamine and histamine can substitute one another in para-haematin complexes. This proves that they can replace each other in the coordination bond of the iron atom and that it is merely a question of concentration and affinity by which substrate the complex is being formed.

Discussion

Spectroscopic examination of surviving tissues has shown that antihistamines inhibit respiration by decreasing the reduction of cytochromes. The question was, on which cytochrome and on what valency state do the antihistamines exert their effect.

The fact that antihistamines inhibit the reduction of cytochromes, means that the antihistamine must be bound to one of the cytochromes in its oxidized form. Thus the catalyst cannot act as an acceptor, and the activated H in the dehydrogenase system cannot reduce it. It follows that oxygen consumption is also diminished. The inhibition of oxyhaemoglobin reduction (1, 2) is a natural consequence of the facts mentioned above.

What happens if the respiratory inhibition caused by antihistamine is being restored by methylene blue? From our experiments the conclusion may be drawn that the process of hydrogen activation must take its normal course, i. e. the hydrogen of the substrate must reach the diaphorase via the corresponding dehydrogenase and co-enzyme, and reduce it. It is known that methylene blue can accept hydrogen from reduced diaphorase, but not directly from the activated substrate. The leukomethylene blue formed, being auto-oxidable, can replace the carrier-oxidase system inhibited by the antihistamine.

The next problem consisted in determining the cytochrome on which the antihistamine acts. The least probable is an effect on cytochrome-c, as, according to present knowledge, its central iron atom forms the strongest coordination bond with haemo-chromogen forming groups (5,6), and is, therefore, at that point usually protected against factors affecting respiration. Considering this, the experiments were carried out with pure cytochrome-c and antihistamine. The spectroscopic examinations performed furnished additional evidence that antihistamines do not combine with that cytochrome component. Thus it must be assumed that the antihistamine is acting on either cytochrome-a or cytochrome-b. Taking into consideration the properties of cytochrome-a which

resemble in auto-oxydability, redox-potential, etc. rather cytochrome-c than -b(7) it can be concluded that the respiratory inhibition caused by antihistamines occurs at the border of the dehydrogenase and carrier-oxidase systems, most probably at the cytochrome-b. Various examinations carried out with redox dyes also support this assumption (1, 2).

As to the chemical mechanism of the antihistamine-cytochrome, resp. histamine-cytochrome complex formation, no definite conclusions can be drawn from the experiments, but the following hypothesis may be framed.

It is known that haemin constitutes a prosthetic group of cytochromes similarly to all catalysts containing iron. The globin component of the catalyst, the structure of which has not yet been elucidated, combines through the vinyl group and the iron atom of the haemin, in the molecule of the catalyst.

As far as oxidation is concerned, the most essential part of the iron containing catalytic proteins is the point at which the central iron atom is linked with its coordination bonds to the haemochromogen-forming histidine groups and through these to the protein part of the catalyst. The chemical constitution of this linkage is as follows. The imino-N contained in the imidazol ring of histidine is bound to the iron atom, whereas the COOH or NH_2 group of the side chain is linked to the globin part.

In general, all the inhibiting effects hitherto known which may give rise to disturbances in the cytochrome-cytochrome-oxidase system of the tissues, occur at the coordination linkage of the iron atom. From that fact, as from our experiments and the results of *Langenbeck* (4) and *Stern* (3) it may be concluded that inhibition of antihistamines occurs at the coordination bonds of the central iron atom of the heavy metal catalyst. There the antihistamine nitrogen base displaces from its coordination bond one of the loosely bound histidines which play a considerable part in oxidoreduction. The effect is similar to that of cyanide and of other inhibitors, forming complexes with an iron catalyst which thus changes its catalytic properties.

As to the problem how histamine abolishes the respiratory inhibition produced by antihistamines, or how it restores the original function of cytochromes, no answer can be given. Two hypotheses are possible. Histamine may displace the antihistamine from its coordination bond, making thus possible that the original constitution of the catalyst be restored : or the histamine may replace the antihistamine and, being an imidazol compound just as histidine, it may continue to function instead of histidine in the molecule of the heavy metal protein.

These are, however, mere suppositions, the corroboration of which needs further evidence, Nevertheless, the present investigations seem to provide further support to our hypothesis that the basis of the antagonism between histamine and antihistamines lies in their effect on iron-containing catalysts.

Summary

1. Antihistamines inhibit the reduction of cytochromes. Concerning the nature of the inhibition, it may be assumed that antihistamine forms a complex with the central iron atom of one of the iron catalysts.

2. Both antihistamines and histamine readily form complexes with haematin and may be substituted with one another in these complexes.

3. It seems most probable that antihistamines exert their action on cytochrome-b.

LITERATURE

1. *I. Huszák—J. Domonkos:* Acta Allergologica *IV.* 47, (1951).
2. *I. Huszák—J. Domonkos:* Acta Allergologica *IV.* 53, (1951).
3. *K. G. Stern:* Z. f. physiol Chem. *215*, 35, (1933).
4. *W. Langenbeck, R. Hutschenreuter, W. Rottig:* Ber. Chem. Ges. *65*, 1750, (1932).
5. *H. Theorell:* Ergebnisse der Enzymforschung *IX.* 248.
6. *H. Theorell* and *I. Akeson:* Amer. Chem. Soc. **63**, 1804; (1941).
7. Advances in protein chemistry. Vol. IV. 423.

ДЕЙСТВИЕ АНТИГИСТАМИНОВ НА МОЗГОВОЕ ДЫХАНИЕ

И. Домонкош и И. Хусак

Невропатологический исследовательский институт университета, г. Сегед

Р е з ю м е

1. Антигистамины препятствуют редукции цитохромов. Относительно прмроды этого торможения можно установить, что антигистамины образуют комплекс с центральным железным атомом одного из железных катализаторов.

2. Антигистамины и гистамин легко образуют комплексы с гематином. В комплексах субстраты взаимозаменяемы.

3. Вероято, что антигистамины действуют у цитохром —б.

DIE WIRKUNG DER HÄMOLYSE AUF DEN STOFFWECHSEL DER ROTEN BLUTKÖRPERCHEN BEIM MENSCHEN

Von

M. SZÉKELY, S. MÁNYAI und F. B. STRAUB

MEDIZINISCH- CHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen am 15. Juli 1952)

Die Beschädigung der Struktur der lebenden Zellen führt zu einer Veränderung ihres Stoffwechsels. Dies kommt in erster Linie darin zum Ausdruck, dass das Gleichgewicht der synthetisierenden und abbauenden Prozesse gestört wird, wodurch die Abbauprozesse allmählich die Oberhand gewinnen und der Stoffwechsel auf diese Weise abnimmt, eventuell sogar vollkommen aufhört. Dies ist ein allgemeiner und selbstverständlicher Satz der biologischen Chemie. Wenn man ihn jedoch näher betrachtet, so scheint er eher nur eine Hypothese zu sein, weil es keine konkreten Angaben darüber gibt, *welche* Änderung der Struktur bzw. die Störung *welchen* Stoffwechselprozesses die Verschiebung des Abbau-Synthese-Gleichgewichts hervorruft.

Die Untersuchung dieses Problems wird durch den Umstand erschwert, dass die Prozesse der Atmung und der Fermentation bei der Beschädigung der Zellstruktur nicht unbedingt aufhören. In einzelnen Fällen geht die Atmung noch in unveränderter Intensität weiter, obwohl für die Zellen keine verwendbare Energie mehr entsteht, d. h. der Stoffwechsel seine Aufgabe nicht mehr erfüllt. Näher der Lösung kamen diejenigen Ergebnisse, die bei der Untersuchung der Synthese von energiereichen Phosphatestern gewonnen wurden und aus denen hervorging, dass dieser Prozess bei einer geringfügigen Schädigung der Struktur langsamer wird oder aufhört. Doch auch in diesem Falle ist es unbekannt, auf welche Weise die Schädigung des Stoffwechsels zustandekommt.

Um der Lösung dieser Fragen näher zu kommen, wurde in unserem Institut zur Untersuchung des Stoffwechsels der Zellen eine neue Methode angewendet, und zwar die Messung des Adenosintriphosphat(ATP)-Gehalts der Zellen. Im Falle der roten Blutkörperchen kann der Zusammenhang zwischen dem ATP-Gehalt der intakten Zellen und der Zellstruktur in vitro gut beobachtet werden. An roten Blutkörperchen vom Menschen, die ihre Energie durch Glykolyse erzeugen, wurde nach Hämolyse der Zellen die Veränderung des ATP-Gehalts untersucht. Es wurde auch geprüft, in welchen Teilprozessen eine Veränderung ihrer Geschwindigkeit infolge der Hämolyse eingetreten war.

Methodik

Bei den Versuchen wurde defibriniertes Menschenblut verwendet. Die Herstellung der Hämolysate erfolgte auf zweierlei Weise :

a) *Osmotisches Hämolysat.* Die zentrifugierten roten Blutkörperchen wurden mit einem doppelten Volumen auf 0° C gekühlten Wassers bei 0° C während 15 Minuten hämolysiert. Zum Schutz der Fermentation wurde nach Beendigung der Hämolyse jeweils 0,2% Nikotinsäureamid (NSA) dem Hämolysat zugefügt.

b) *Gefrorenes Hämolysat.* Die zentrifugierten roten Blutkörperchen wurden bei —12° C zum Gefrieren gebracht und dann 1/2—1 Stunde auf derselben Temperatur gehalten. Danach wurden die gefrorenen Blutzellen in einem 37° C warmen Wasserbad aufgetaut. Wenn das Hämolysat mit NSA oder Hexosediphosphat (HDP) versetzt wurde, so erfolgte die Zugabe zu den roten Blutkörperchen vor dem Gefrieren.

Die Bestimmung des ATP wurde nach dem Verfahren von *Kramer-Petikó-Straub* (1), die Bestimmung des Phosphats nach der Methode von *Fiske-Subbarow* und die Bestimmung der Milchsäure nach den Angaben von *Barker* und *Summerson* (2) vorgenommen. Die Bestimmung des mit Säuren hydrolysierbaren Phosphats (P_7) erfolgte durch eine 10 Minuten lang währende Hydrolyse bei 100° C in einem n HCl-Medium, und die des mit Alkalien hydrolysierbaren Phosphats (P_3) durch eine 3 Minuten lang währende Hydrolyse bei 100° C in einem n/5 KOH-Medium.

Ergebnisse

I. Osmotisches Hämolysat

Wenn rote Blutkörperchen vom Menschen auf osmotischem Wege mit 2 Volumina Wasser hämolysiert werden und das Hämolysat bei 37° C inkubiert wird, so zeigt dessen ATP-Gehalt eine langsame Verminderung : der ATP-Gehalt des Blutes sinkt in rund 30 Minuten auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes. Die Abnahme des ATP-Gehalts kann im Prinzip auf zweierlei Weise zustande kommen : entweder durch die Aktivierung der Abbauprozesse oder durch die Hemmung des Synthetisierungsprozesses, der Glykolyse. Zwecks Trennung dieser zwei Prozesse wurde untersucht, ob der ATP-Gehalt des Hämolysats auch dann dieselbe Veränderung aufweist, wenn die Glykolyse geschützt wird. Bei der Hämolyse der roten Blutkörperchen geht nämlich auch eine ihr glykolytisches System schädigende Veränderung vor sich, indem die an der äusseren Fläche der roten Blutkörperchen befindliche Diphosphopyridinnukleotidase (DPNase) die Kozymase zersetzt (3), wodurch die Glykolyse, und als Folge davon die ATP-Synthese geschädigt wird. Die DPNase Tätigkeit kann gehemmt werden, wenn dem Hämolysat 0,2% Nikotinsäureamid (NSA) zuge-

geben wird. Auf diese Weise ist es möglich, die Glykolyse des osmotischen Hämolysats auf einem dem intakten Blut entsprechenden Wert zu halten.

Der ATP-Gehalt eines mit NSA versetzten Hämolysats bleibt auch während der Inkubation unverändert (vgl. Tabelle I), was darauf hinweist, dass die Synthetisierungs- und Abbauprozesse in diesem System genau so im Gleichgewicht sind wie im intakten Blut.

TABELLE I

Die Wirkung von Nikotinsäureamid (NSA) auf den ATP-Gehalt des osmotischen Hämolysats

Zeit Minuten	Hämolysat + Nikotinsäureamid	Kontrolle
	ATP µg/ml	
0	190	185
45	200	75

Wenn durch die Zugabe von NSA erreicht wird, dass der ATP-Gehalt des osmotischen Hämolysats nicht abnimmt, so kann gleichzeitig auch bewiesen werden, dass die Abbau- und Synthetisierungsprozesse mit der ursprünglichen Intensität weitergehen. Den Beweis dafür liefert der Umstand, dass bei Hinzufügung von Fluorid der ATP-Gehalt des Hämolysats ebenso sinkt wie der ATP-Gehalt von intakten roten Blutkörperchen.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass das NSA nur in Hämolysat von menschlichen roten Blutkörperchen imstande ist die ATP-Synthese aufrechtzuerhalten. Bei den mit Hunde-, Katzen- und Kaninchenblut ausgeführten ähnlichen Versuchen wurde gefunden, dass nach einer mit 2 Volumina Wasser erfolgten Hämolyse der ATP-Gehalt des Blutes auch in Gegenwart von NSA sehr schnell abgebaut wird.

II. Gefrorenes Hämolysat

Wenn das Blut durch Gefrierenlassen und Auftauen hämolysiert wird, so geht im Hämolysat der Abbau des ATP mit sehr grosser Geschwindigkeit vor sich. In 5—10 Minuten wird die Hälfte des ATP-Gehaltes des Blutes abgebaut. In gefrorenen Hämolysaten ist es nicht möglich, den ATP-Abbau durch Zugabe von NSA zu verhindern. In diesen Systemen wird auch die Glykolyse nicht durch das NSA geschützt, und aus der als Substrat verwendeten Glukose kommt es im gefrorenen Hämolysat zu keiner Milchsäureproduktion.

Es wurden die im gefrorenen Hämolysat den Abbau des ATP bewirkenden einzelnen Prozesse untersucht und ihr Ablauf mit den analogen Reaktionen im intakten Blut und im osmotischen Hämolysat verglichen. Von den die

Spaltung des ATP bewirkenden Systemen müssen bei den menschlichen roten Blutkörperchen in erster Linie drei Mechanismen in Betracht gezogen werden. Der ATP-Abbau kann entweder auf die Wirkung der ATPase hin auf hydrolytischem Wege erfolgen, oder aber durch Transphosphorylierung mit Hilfe der Hexokinase bzw. der Phosphohexokinase. Diese Teilprozesse wurden gesondert untersucht. Wenn bei den Versuchen die Veränderungen des ATP-Gehaltes beobachtet wurden, so enthielt das gefrorene Hämolysat zur Verhinderung der DPNase in jedem Falle 0,2% NSA.

1. *Phosphohexokinasereaktion*

Die Phosphorylierung des Glukose-6-phosphats geht im gefrorenen Hämolysat mit überaus grosser Geschwindigkeit vor sich. Wenn dem Hämolysat Robison-Ester (Hexose-6-monophosphat) zugefügt wird, so braucht dieses das

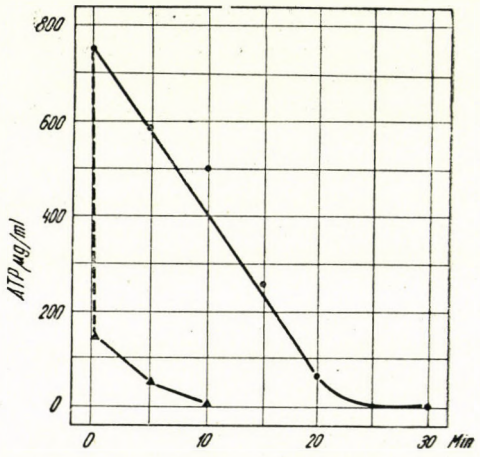


Abb. 1. Die Phosphorylierung von Robison-Ester im gefrorenen Hämolysat.
o——o gefrorenes Hämolysat + $2 \cdot 10^{-2}$ *M* Glukose
▶——▶ gefrorenes Hämolysat + $8 \cdot 10^{-3}$ *M* Robison-Ester (K-Salz)

vorhandene ATP schon bei Zimmertemperatur in so kurzer Zeit auf, dass in sofort nach Vermischung entnommenen Proben (nach etwa 30 sec.) nur noch ein kleiner Teil der ursprünglichen ATP-Menge vorgefunden werden kann (Abb. 1).

Für den Mechanismus dieses raschen ATP-Verbrauchs bietet die Untersuchung der Phosphatfraktionen eine Erklärung. Wenn eine geringe Menge Robison-Ester dem Hämolysat zugesetzt wird, zu dessen Phosphorylierung nicht der gesamte ATP-Gehalt der roten Blutkörperchen aufgebraucht wird, so verschwindet die äquivalente Menge ATP gleichfalls augenblicklich, während der

Abbau des verbleibenden ATP dann langsamer stattfindet als in dem als Kontrolle verwendeten (Glukose an Stelle von Hexosephosphat enthaltenden) Hämolysat. Gleichzeitig mit der sich in einem Augenblick abspielenden ATP-Verminderung erfolgt in der mit Säure hydrolysierbaren Phosphatfraktion eine dementsprechende Phosphatabnahme und in der im basischen Medium hydrolysierbaren Phosphatfraktion eine Phosphatzunahme. In dem in Abb. 2 veranschaulichten Versuch sinkt die aus der ATP-Bestimmung errechnete hydrolysierbare Phosphatmenge von 107 μg P/ml (was dem Kontrollwert entspricht) auf 65 μg P/ml, während das im alkalischen Medium hydrolysierende Phosphat von dem auf

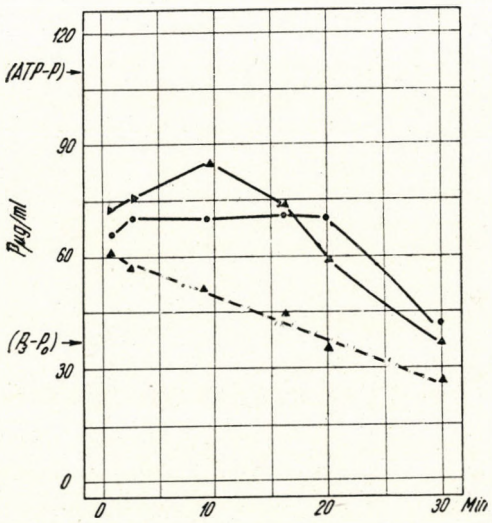


Abb. 2. Die Phosphorylierung von Robison-Ester im gefrorenen Hämolysat. Die Veränderung der Phosphatfraktionen

Robison-Ester $1{,}35 \cdot 10^{-3}$ *M*
Phosphatgehalt des Kontrollhämolysats:
Säurelabiles Phosphat (aus ATP-Bestimmung): 107 μg/ml
In alkalischem Medium hydrolysierbares Phosphat: 11 μg/ml
In alkalischem Medium hydrolysierbares Phosphat zusammen mit dem Robison-Ester: 27 μg/ml
1. ▲————▲ in sauerem Medium hydrolysierbares Phosphat
2. • — • — • aus der ATP-Bestimmung berechnetes säurelabiles Phosphat
3. ▲— — —▲ in alkalischem Medium hydrolysierbares Phosphat (P_3-P_0)
Die Pfeile bezeichnen die der Kontrolle entsprechenden P-Werte

Grund der Phosphatkonzentration des Kontrollhämolysats und des Robison-Esters berechneten Wert von 38 μg P/ml bis zur Bestimmung des ersten Wertes (30 sec.) sich auf 60μg P/ml erhöht. Diese Erhöhung entspricht jener Reaktion, bei welcher die säurelabile Phosphatgruppe des ATP unter dem Einfluss der Phosphohexokinase zur weiteren Phosphorylierung des Robison-Esters verbraucht wird, wobei im alkalischen Medium hydrolysierende Phosphatester, HDP und im Verlaufe weiterer Umwandlungen Triosephosphate usw. entstehen.

2. *Hexokinasereaktion*

Der ungestörte Ablauf der Hexokinasereaktion bedarf keines weiteren Beweises in jenen Systemen, welche die Glukose zu fermentieren imstande sind. Das NSA enthaltende, osmotische Hämolysat von intakten roten Blutkörperchen produziert aus der Glukose als Substrat bedeutende Mengen Milchsäure, es vermag also das labile Phosphat des ATP auf das Glukosemolekül zu übertragen.

In *gefrorenen Hämolysaten* bildet sich aus Glukose keine Milchsäure. Um zu bestimmen, die Hemmung welcher Zwischenstufe der Fermentation das Aufhören der Milchsäureproduktion verursacht, wurde untersucht, ob die nach der Phosphorylierung der Glukose auftretenden Reaktionen sich auch im gefrorenen

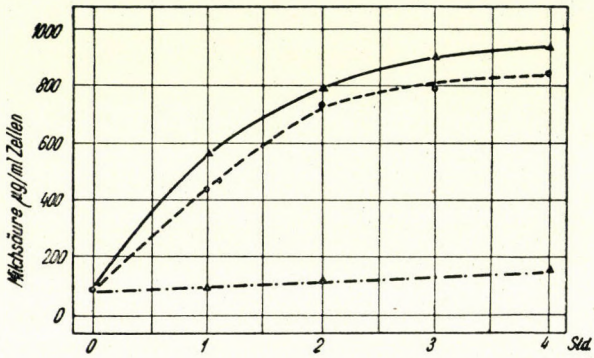


Abb. 3. Die Milchsäureproduktion des gefrorenen Hämolysats aus Glukose und HDP
Gefrorenes Hämolysat + $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ *M* $MgCl_2$ +
▲—·—·—▲ $9{,}10^{-3}$ *M* Glukose
○— — —○ $9 \cdot 10^{-3}$ *M* Glukose + 0,3 ml Hexokinase
▲————▲ $3{,}2 \cdot 10^{-3}$ *M* HDP

Hämolysat abspielen. Deshalb wurde als Fermentationssubstrat HDP an Stelle von Glukose verwendet.

Aus HDP erzeugte das gefrorene Hämolysat mit grosser Geschwindigkeit Milchsäure.

Mit derselben Geschwindigkeit geht auch die Glykolyse vor sich, wenn das gefrorene Hämolysat mit Glukose und Hexokinase versetzt wird (Abb. 3).

Der Beginn der Glykolyse bedeutet zugleich den Beginn der ATP-Synthese ; die Zusetzung von HDP verhindert die Abnahme des ATP-Gehalts, so dass das gefrorene Hämolysat in Gegenwart von HDP (und NSA) selbst während mehrstündiger Inkubierung seinen ursprünglichen ATP-Gehalt unverändert bewahrt (Abb. 4).

Durch Beifügung von Hexokinase kann diese Wirkung nicht erzielt werden ; die ATP-Spaltung wird zwar durch die Hexokinase verlangsamt, aber nicht verhindert (vgl. Tabelle II).

TABELLE II

Die Wirkung von Glukose + Hexokinase auf die Spaltung des im gefrorenen Hämolysats enthaltenen ATP

Zeit (Minuten)	Hämolysat + Hexokinase	Kontrolle
	ATP µg/ml	
0	1100	—
10	633	340
20	433	80
30	50	50

Es wurde bereits erwähnt, dass Robison-Ester (HMP) eine sofortige Senkung des ATP- Gehalts hervorruft, nach der Phosphorylierung zu HDP setzt jedoch die Glykolyse ein, so dass sich der weitere Abbau des ATP verlangsamt. (In den auf

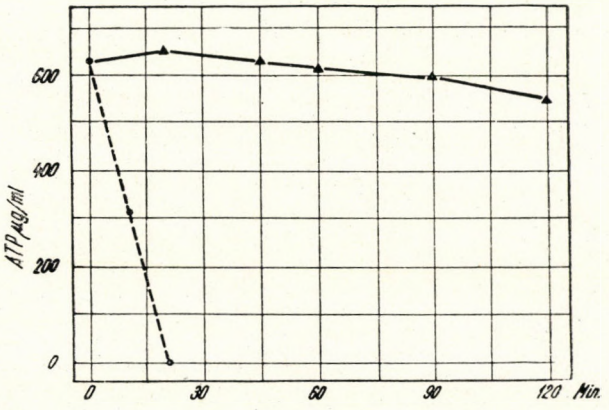


Abb. 4. Die Wirkung von HDP auf den ATP-Gehalt von gefrorenem Hämolysat
Gefrorenes Hämolysat +
○- - - - - -○ Glukose
▲———▲ HDP ($9 \cdot 10^{-3}$ *M*)

Abb. 2 angegebenen Versuchsverhältnissen ist der ATP-Gehalt während ungefähr 20 Minuten konstant). Das entstehende HDP wird aber in kurzer Zeit verbraucht (die Menge der im alkalischen Medium hydrolysierenden Phosphatester nimmt ab), deshalb kann der ATP-Gehalt nicht mehr mit HMP aufrechterhalten werden. Das Versetzen mit mehr HMP hat hingegen zur Folge, dass das HMP selbst das ATP verbraucht.

Das Aufhören der Glykolyse kann also demnach nur durch den ersten Schritt, durch das Ausbleiben der Bildung von Glukose-6-phosphat, verursacht

werden. Der Ausfall der Phosphorylierung wird daher entweder durch die Inaktivierung der Hexokinase oder durch den Mangel an dem einen Substrat, an ATP, hervorgerufen.

Gegen die Inaktivierung der Hexokinase sprechen die Untersuchungen von *Weil-Malherbe* (4), bei denen es gelang, im gefrorenen Hämolysat Hexokinaseaktivität nachzuweisen. Dies wird auch durch die Versuche der Verfasser vorliegender Abhandlung bestätigt, die den Beweis erbrachten, dass die Phosphorylierung der Glukose im gefrorenen Hämolysat in Gegenwart von Fluorid gut nachgewiesen werden kann.

In der Gegenwart von Glukose, ATP und 0,02 M NaF [bei dieser NaF-Konzentration ist die ATPase der roten Blutkörperchen schon stark gehemmt

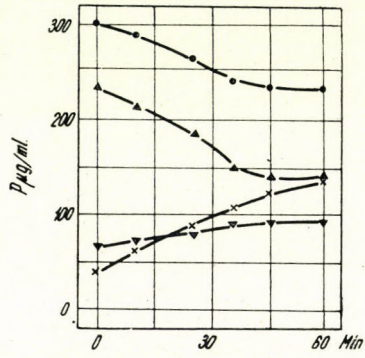


Abb. 5. Die Tätigkeit der Hexokinase im gefrorenen Hämolysat
10,0 ml gefrorenes Hämolysat
2,0 ml 0,166 *M* NaF
2,5 ml 0,02 *M* ATP
1,0 ml 0,3 *M* Glukose
1,0 ml 0,1 *M* $MgCl_2$
▼——▼ anorganisches Phosphat (P_0)
▲——▲ säurelabiles Phosphat (P_7—P_0)
•——• P_7
×——× in alkalischem Medium hydrolysierbares Phosphat

(5)] verschwindet im gefrorenen Hämolysat die labile Phosphatgruppe des ATP und es erscheint im Laufe der Inkubierung ein in alkalischem Medium hydrolysierender Phosphatester, das Hexosephosphat (Abb. 5). Das Verschwinden des ATP (Abnahme von P_7—P_0) wird hier nur in geringem Ausmass vom Erscheinen des anorganischen Phosphats begleitet, es geht grösstenteils im Wege einer Abnahme von P_7, also der Entstehung von schwer hydrolysierbaren Phosphatestern vor sich. Die Menge des entstehenden, in alkalischem Medium hydrolysierenden Phosphats übertrifft die Menge des verschwindenden, in saurem Medium hydrolysierenden Phosphats : dies entspricht jenem Prozess, bei welchem das durch die Hexokinasereaktion gebildete Glukose-6-phosphat mit ATP weiter zu HDP phosphoryliert wird, woraus dann im Laufe weiterer Umwandlungen Triosephosphate entstehen, die auch säurelabile Phosphatgruppen enthalten.

Demnach kommt es also im gefrorenen Hämolysat trotz der Gegenwart von aktiver Hexokinase und eines aktiven glykolytischen Systems zu keiner Glykolyse, was nur durch den Umstand erklärt werden kann, dass das Substrat der Hexokinase, das ATP, fehlt. Zur Bestätigung der Richtigkeit dieser Annahme wurden folgende Versuche ausgeführt. Die Glykolyse des gefrorenen Hämolysats wurde manometrisch gemessen, nach Zugabe von ATP und ohne Zugabe. Wie aus Abb. 6 ersichtlich, kann die Glykolyse nur in Gegenwart von ATP wahrgenommen werden und dauert nur solange, als das ATP nicht völlig abgebaut ist. Zur Kontrolle durchgeführte Milchsäurebestimmungen ergaben, dass eine der CO_2-

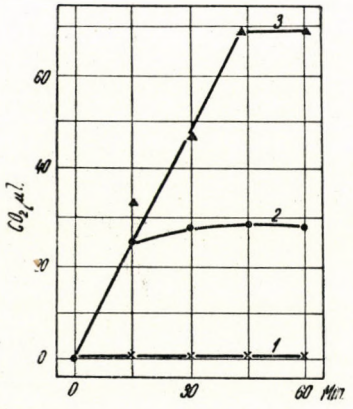


Abb. 6. Die Wirkung von ATP auf die Glykolyse des gefrorenen Hämolysats.
CO_2-Produktion nach der Warburg'schen Methode bei 37°C. In jedem Gefäss 1 ml gefrorenes Hämolysat von menschlichen roten Blutkörperchen, 0,005 *M* $MgSO_4$, 0,3% NSA, 0,15 *M* $NaHCO_3$, im Gasraum 5% CO_2 und 95% N_2, Gesamtvolumen 3 ml. Nach 30' Vorschütteln aus der Birne eingekippt: 1 : isotonisches NaCl ; 2 : 1 mg ATP ; 3 : 2 mg ATP. Milchsäureproduktion während 60' : 1. 0
2. 0,2 mg
3. 0,32 mg

Produktion entsprechende Menge von Milchsäure entstanden war : die aktivierende Wirkung des ATP bedeutet also nicht eine durch die hydrolytische ATP-Spaltung verursachte CO_2-Produktion, sondern eine Steigerung der Glykolyse.

3. *ATPase*

In den roten Blutkörperchen ist die ATPase nach den Untersuchungen von *Garzó*, *Ullmann* und *Straub* (5) ein an die Membran der roten Blutkörperchen gebundenes Enzym. Bei der osmotischen Hämolyse tritt den obigen Ausführungen zufolge keine Veränderung der Aktivität der ATPase ein. Die im gefrorenen Hämolysat herrschenden Verhältnisse sollen durch folgenden Versuch illustriert werden.

Die Membran der roten Blutkörperchen kann in verhältnismässig nativem Zustande isoliert werden, wenn man die roten Blutkörperchen mit einem grossen Volumen Wasser (50 Vol.) hämolysiert. Die Membrane setzen sich nämlich hierbei ab und können dann mit 2500 U/min. abzentrifugiert werden (5). Wenn die Membrane mittels eines solchen Verfahrens bei 0°C in einer möglichst kurzen Zeit isoliert werden, so zeigen sie keine ATPase-Aktivität, die Menge des zugegebenen ATP vermindert sich selbst während zweistündigen Inkubierens nicht. Die ATPase-Aktivität tritt hingegen auf, sobald das inaktive Membranpräparat bei —12°C zum Gefrieren gebracht und nach einigen Minuten bei 38°C aufgetaut wird (Abb. 7).* Im gefrorenen Hämolysat muss daher mit einer aktiven ATPase-Tätigkeit gerechnet werden.

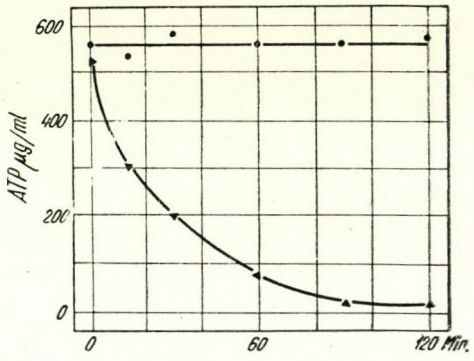


Abb. 7. Die Wirkung des Gefrierens auf die ATPase-Aktivität der roten Blutkörperchenmembrane
2,5 ml natives bzw. gefrorenes Stroma
2,5 ml 0,02 *M* ATP
0,25 ml 0,1 *M* $MgCl_2$
• ——— • natives Stroma
▲ ——— ▲ gefrorenes Stroma

Auf die hydrolytisch vor sich gehende Spaltung des ATP im gefrorenen Hämolysat weist auch die parallele Veränderung des ATP-Gehaltes und der Phosphatfraktionen hin. Die ATP-Spaltung ist mit einer Anreicherung von anorganischem Phosphat verbunden, während die Menge des gesamten hydrolysierbaren Phosphats unverändert bleibt.

Diskussion

Im Laufe ihrer früheren Untersuchungen hatten die Verfasser nachgewiesen, dass bei der osmotischen Hämolyse keine grössere Veränderung in der Membranstruktur der roten Blutkörperchen stattfindet (6). Die hier beschrie-

* Die Verteilung des ATP zwischen Stroma und Suspensionsmittel ist unter diese Bedingungen (1 : 50 Hämolyse) gleichmässig, bei Anwendung von nativem, sowie auch von gefrorenem Stroma. Das Erscheinen der ATP-Spaltung kann also nicht dadurch erklärt werden dass das ATP erst durch die vollkommene Zerstörung der Membranstruktur der ATPase zugänglich wird. Die Strukturänderung bewirkt hier eine direkte Aktivierung des Fermentes.

benen Versuche weisen im Einklang mit den früheren darauf hin, dass dabei weder in den einzelnen Teilprozessen des ATP-Stoffwechsels noch in deren Koordination eine wesentliche Veränderung eintritt. Die bei der osmotischen Hämolyse beobachtete langsame Abnahme des ATP-Gehalts ist das Ergebnis der DPNase-Tätigkeit. Wenn dieser Prozess durch NSA gehemmt wird, so bleibt der ATP-Gehalt des Hämolysats ähnlich wie beim intakten Blut konstant. Im Laufe der Untersuchungen über den Stoffwechsel der roten Blutkörperchen wurde eine solche Übereinstimmung nicht nur in Bezug auf den ATP-Gehalt und die ATP spaltenden Prozesse bei der Prüfung der intakten Blutzellen und des osmotischen Hämolysats gefunden, sondern die beiden Systeme unterschieden sich auch hinsichtlich anderer Teilprozesse der Stoffwechselvorgänge nicht voneinander.

Diese Feststellung besitzt nur für menschliche rote Blutkörperchen Geltung. Die roten Blutkörperchen des Hundes, der Katze und des Kaninchens erleiden bei der osmotischen Hämolyse anscheinend grössere Schädigungen als die des Menschen, was eine ATPase-Aktivierung zur Folge hat. Dies bietet die Erklärung für die Tatsache, dass in einem aus dem Blute dieser Tiere hergestellten Hämolysat das NSA das Verschwinden des ATP nicht verhindern kann.

Die durch Gefrieren erfolgte Hämolyse ruft auch in der Struktur der Zellmembrane von menschlichen roten Blutkörperchen tiefgreifende Veränderungen hervor. (Darauf weist z. B. auch der Umstand hin, dass die Erscheinung der »reversiblen Hämolyse« bei gefrorenen Hämolysaten nicht festgestellt werden kann). Parallel mit der Schädigung der Membranstruktur verändert sich auch der ATP-Stoffwechsel in bedeutender Weise. *Die primäre Veränderung ist die auf Einfluss des Gefrierens eintretende Aktivierung der ATPase.* Das Überhandnehmen des Abbauprozesses wirkt nicht nur unmittelbar auf den ATP-Gehalt ein, sondern verursacht mittelbar ein vollständiges Aufhören der Glykolyse.

Werden die im gefrorenen Hämolysat den ATP-Verbrauch bewirkenden Prozesse mit den in den intakten roten Blutkörperchen und im osmotischen Hämolysat vor sich gehenden entsprechenden Reaktionen verglichen, so gelangt man zu folgenden Feststellungen.

Im gefrorenen Hämolysat sind die die Transphosphorylierung bewirkenden Fermente (Hexokinase, Phosphohexokinase) in aktivem Zustand vorhanden, doch geht in diesem System trotzdem keine Phosphorylierung der Glukose vor sich, weil das im System befindliche ATP aufgebraucht wird und verschwindet. Als Wirkung des Gefrierens tritt die ATPase-Aktivität auf: das Hämolysat spaltet auf Wirkung der ATPase das ATP mit grösserer Geschwindigkeit als es durch die Hexokinase aufgebraucht werden kann. Als Folge davon spaltet sich das ATP in wenigen Minuten auf hydrolytischem Wege vollkommen auf, worauf deshalb die Phosphorylierung der Glukose, die Glykolyse, und damit die ATP-Synthese zum Stillstand kommen. Dieser Prozess kann auf zweierlei Weise verhindert werden.

Wenn der durch Transphosphorylierung erfolgende Abbau des ATP durch Versetzung mit Hexokinase gesteigert wird, so kann die Glykolyse des Hämolysats trotz der ATPase-Aktivität aufrechterhalten werden. Der ATP-Gehalt lässt sich aber auf diesem Wege nicht aufrechterhalten, weil die Geschwindigkeit der durch die Glykolyse hervorgerufenen ATP-Synthese kleiner ist als die Geschwindigkeit der durch Transphosphorylierung und hydrolytischen Abbau bewirkten ATP-Spaltung. Wenn aber als Fermentationssubstrat HDP verwendet wird, so ist hierbei zur Glykolyse keine Phosphorylierung der Glukose notwendig, die Tätigkeit der ATPase hemmt also die Glykolyse nicht. Zur gleichen Zeit muss die Glykolyse bei der ATP-Synthese nur den durch die ATPase hervorgerufenen ATP-Abbau kompensieren, der ATP-Gehalt kann also daher aufrechterhalten werden.

Das aus Blut frisch präparierte Stroma zeigt keine ATPase-Aktivität, die Enzymaktivität tritt erst als Wirkung des Gefrierens oder einer auf anderem Wege erfolgenden Denaturierung gewissen Grades auf. Die Aktivierung ist die Folge einer strukturellen Veränderung. Ein Hinweis darauf besteht darin, dass ein vollkommen von ATPase-Aktivität freies Stroma nur bei überaus vorsichtiger Präparation gewonnen werden kann. Wenn die Hämolyse oder die Zentrifugierung des Stromas nicht genügend rasch erfolgen, so tritt eine geringfügige Aktivität der ATPase schon während des Stehens des Stromas ein und verursacht eine langsame, ausgeprägte ATP-Spaltung. Durch Gefrieren kann indessen auch die ATPase-Aktivität eines solchen Stromas in grossem Ausmass gesteigert werden. Auf Grund dieser Tatsachen kann mit grosser Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass in intakten Blutkörperchen unter normalen Verhältnissen keine ATPase-Aktivität besteht. Im osmotischen Hämolysat konnte es zu keiner wesentlichen Aktivierung der ATPase kommen. Im intakten Blut und im osmotischen Hämolysat geht daher der ATP-Abbau nur durch Transphosphorylierung vor sich.

In Bezug auf die menschlichen roten Blutkörperchen muss also gesagt werden, dass der Abbauprozess bei der Schädigung der Zellstruktur durch Gefrieren gegenüber den synthetisierenden Prozessen das Übergewicht erlangt. Dies kommt so zustande, dass im Enzymapparat des synthetisierenden Prozesses keine Schädigung entsteht, sondern dass bei der Zerstörung der Struktur die hydrolytische ATPase-Wirkung in Tätigkeit tritt. Die Schädigung der Struktur ist also keine Verminderung der Aktivität, sondern führt im Gegenteil durch eine Aktivitätserhöhung indirekt zum vollkommenen Aufhören der Synthese.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen von *Meyerhof* (7), der nachgewiesen hatte, dass bei der Fermentation der Hirnzellen und anderer Zellen die Entfernung oder die Hemmung der ATPase die Vorbedingung für das Funktionieren des glykolytischen Systems bildet. Auch die hier beschriebenen Versuche zeigen, dass wenn die ATPase-Wirkung das Übergewicht erlangt, dies ein Aufhören der normalen Glykolyse zur Folge haben kann. Ausserdem ist

es bekannt, dass die Glykolyse in Systemen, die ganz frei von ATPase sind infolge Fehlens von Phosphatakzeptoren nicht möglich ist. Es hat also den Anschein, als ob die ATPase ein wichtiger Regulator der Glykolyse wäre. Da nach den hier behandelten Untersuchungen die ATPase einerseits in den intakten Blutzellen in einem praktisch inaktiven Zustande vorhanden ist und sie andererseits durch die Schädigung der Struktur maximal aktiviert wird, so ergibt sich die interessante Möglichkeit, dass die Glykolyse durch kleinere Veränderungen der Struktur reguliert wird.

Es kann heute noch keine Antwort auf die Fragen gegeben werden, warum die ATPase-Aktivität nach dem Gefrieren eintritt und warum keine ATPase-Aktivität in den intakten roten Blutkörperchen vorhanden ist. Die auf der Hand liegende Annahme, dass sich die ATPase ausserhalb der Membranoberfläche der roten Blutkörperchen befindet und somit räumlich von dem im Inneren der Blutzellen befindlichen ATP getrennt ist, muss abgelehnt werden, weil die intakten roten Blutkörperchen das von aussen zugegebene ATP nicht spalten. Wenn man den physikalischen Einfluss des Gefrierens in Rechnung stellt so dürfte als Grund für das Erscheinen der Fermentaktivität die Zersetzung der Lipoid- bzw. Lipoproteinstruktur der Membran in Betracht kommen.

Zusammenfassung

1. In den roten Blutkörperchen des Menschen bildet die intakte Struktur der Zellmembran die Vorbedingung für die Aufrechterhaltung des ATP-Gehalts.

2. Die auf osmotischem Wege erfolgende Hämolyse, die keine Schädigung der Membranstruktur zur Folge hat, verursacht keine wesentliche Veränderung im ATP-Stoffwechsel. Im Hämolysat tritt eine langsame Abnahme des ATP-Gehalts ein, was auf die DPNase-Aktivität zurückzuführen ist, die indirekt die fermentative ATP-Synthese hemmt. Die Senkung des ATP-Gehalts kann durch NSA verhindert werden.

3. Bei Hämolyse durch Gefrierenlassen erleidet die Zellmembran strukturelle Veränderungen. Als Folge davon setzt die Aktivität der an die Membran gebundenen ATPase ein, was einerseits das Überhandnehmen der Abbauprozesse bedeutet, und andererseits mittelbar die weitere Aufrechterhaltung des Synthetisierungsprozesses verhindert.

4. Die Schädigung des Stoffwechsels kommt in diesem Falle paradoxerweise so zustande, dass das Enzymsystem der Synthetisierungsprozesse überhaupt keine Schädigung erleidet, sondern dass bei der Schädigung der Struktur ein neues abbauendes Enzym auftaucht, das bisher nur in inaktivem Zustand gegenwärtig war.

5. In intaktem Blut wird das ATP nur durch Transphosphorylierung abgebaut und verbraucht. In intakten menschlichen roten Blutkörperchen ist keine ATPase-Aktivität vorhanden.

LITERATUR

1. *Kramer, M., Pettkó, E., Straub, F. B.:* Kísérletes Orvostud, **1**, 114, (1949).
2. *Barker, S. B., Summerson, W. H.:* J. Biol. Chem. **138**, 535, (1941).
3. *Alivisatos, S. G. A., Denstedt, O. F.:* Science **114**, 281, (1951).
4. *Weil—Malherbe, H., Bone, A. D.:* Biochem. J. **49**, 348, (1951).
5. *Garzó, T., Ullmann, A., Straub, F. B.:* Acta Physiol. Hung. **3**, **513** (1952).
6. *Székely, M., Mányai, S., Straub, F. B.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 571 (1952).
7. *Meyerhof, O.:* Arch. Biochem. **32**, 246, (1949).

ВЛИЯНИЕ ГЕМОЛИЗА НА ОБМЕН ВЕЩЕСТВ КРАСНЫХ КРОВЯНЫХ ШАРИКОВ У ЧЕЛОВЕКА

М. Секей, С. Маньаи и Ф. Б. Штрауб

Медицинско-химический институт медицинского университета, Будапешт.

Резюме

1. Невредимая структура клеточной оболочки в красных кровяных шариках человека является предпосылкой для поддерживания содержания АТФ.

2. Возникающий осмотическим путем гемолиз, не имеющий следствием повреждения структуры-оболочки, не вызывает значительного изменения в обмене веществ АТФ. В гемолизате наблюдается медленное понижение содержания АТФ, что следует отнести к активности ДПН-азы, которая косвенно тормозит синтез АТФ. Снижению содержания АТФ можно препятствовать амидной кислотой никотина.

3. При гемолизе, вызванном замерзанием, клеточная оболочка подвергается структурным изменениям. Следствием этого проявляется активность (связанной к оболочке АТФ-азы), что, с одной стороны, означает усиление процесса разложения, а с другой стороны, непосредственно препятствует дальнейшему поддерживанию синтезирующего процесса.

4. В невредимой крови АТФ расходуется и распадает исключительно путем трансфос-форилирования. В невредимых красных кровяных тельцах человека не существует активности АТФ-азы.

5. В данном случае нарушение обмена веществ осуществляется парадоксально таким образом, что энзиматической системе процессов синтеза не причиняется никакого вреда, а при повреждении этой структуры появляется новый разлагающий энзим, который до сих пор присутствовал в неактивном состоянии.

NEUROHUMORAL MECHANISM OF THE SEXUAL FUNCTION OF MALE FROGS

By

A. J. ÁNGYÁN and Z. P. SOÓS

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, OF THE MEDICAL UNIVERSITY, PÉCS

(Received : 9, July 1952)

Exploration of general behaviour, reflexes and hormonal functions independently from each other is suited mainly for investigating into physical or chemical problems of the living body in a restricted sense. For investigating the intrinsic nature and evolution of integrative correlations a more exact experimental approach is desirable. This involves a simultaneous study of neural and humoral regulations and of the action of environmental factors.

The role of sexual functions in behaviour has been since *Darwin* the main object of descriptive naturalists and psychologists or psychopathologists, as, for instance, *Freud*. From a physiological point of view the problem has been dealt with chiefly from its neural aspect.

The synthetic study of reflex functions of the whole organism had been first attempted by *Pavlov* (1). According to *Pavlov*, the investigation of animal behaviour has to deal with three main problems : (I) the special complicated unconditioned reflexes, i. e. the function of the brain stem ganglia, furnishing the basis for the external activity of the living organism : (II) the functions of the cerebral cortex : and (III) the interaction of these and their integration.

Breeding reflexes are one of the main groups of *Pavlov*'s unconditioned reflexes. Conditioned reflexes associated with them have not been systematically investigated. Psychological monographs in this field deal only with unlearned basic behaviour (2).

Recent data and trends of neuroendocrinology have opened the possibility of a physiological synthesis of behaviour, based on fundamental reflex actions, endocrine factors, acquired reflexes and their relations to other functions.

Some features of previously investigated sexual functions and reflexes seem to furnish a basis for a synthesis of neurohumoral correlations on lower, higher, and perhaps also on the highest levels. These are the following.

(I) In most animals in at least one of the sexes, sexual behaviour and tissue functions are definitely cyclic and determined mainly by hormonal factors.

(II) In some animals, such as the rabbit, external stimuli may elicit purely by reflex action sexual behaviour and corresponding tissue changes depending otherwise on hormonal influences.

(III) Changes of reflex behaviour in the sexual period may be attributed to a dominant state of the nervous system, in which the manifestation of other reflexes is suppressed and a great variety of external stimuli reinforce sexual reflexes. (The term »dominant state« of the nervous system was formulated by *Uchtomsky* (3) partly in connection with sexual reflexes.)

(IV) Some reflexes apparently unrelated to sexual behaviour in the every day life of the animal are nevertheless associated with sexual factors. These and sexual reflexes are all of the facultative type and have a relatively long latency. This may be due to humoral factors involved. [Some of the »scratch« reflexes, »neck-patting« reflexes of rabbits, cats and apes. (4)]

Furthermore, modern investigations throw more and more light on such pathological symptoms of the nervous system (myatonia, myasthenia, some psycho-nervous disorders) which are closely related to functional changes of the sex glands.

The present study was limited to some of the neurohumoral correlations in the frog. The observation, that administration of gonadotrophin before, or simultaneously with, sperm voiding may elicit the clasping reflex which otherwise appears only during the mating season, served as a starting point.

Methods

The *Galli—Mainini test* (5, 6) was performed by injecting choriongonadotrophin (Organon Pregnyl) into the dorsal lymph sack. Five grades of the test

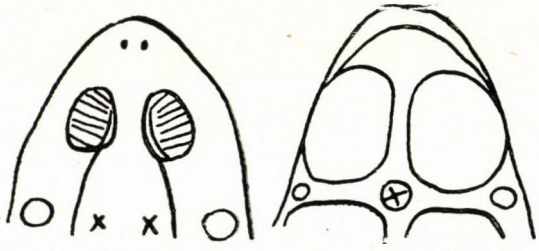


Fig. 1. a) Site of electrodes on the head of the frog; *b)* Hypophysectomy on frog

were distinguished using a 90-fold-magnification (7). (1) 3 to 10 spermia per visual field, (2) 10 to 100, (3) 100 to 100, (4) 200 to 300, and (5) more than 300 spermia. The clasping reflex was tested before and 30, 60 and 90 minutes after injecting the gonadotrophin, and repeated several times for some hours and on the following day. In some cases the response of the clasping reflex was recorded by a

balloon, connected to a *Marey* capsule. In some experiments, prolonged electrical stimulation of various cerebral regions was carried out, on animals both awake and anaesthetized with 1 to 1,5 ml of 25 per cent urethane or aether. The site of electrical stimulation was histologically controlled (Fig. 1. a.). The effect on the reaction and on the endocrine apparatus of various operations on the CNS such as extirpation of forebrain, midbrain, decapitation, transection of the spinal cord at the 1st and the 7—9th segments was studied in connection with the reaction. Hypophysectomy was performed according to *Abderhalden* (8) but by employment of an electric drill total elimination of the parabasal bone could be avoided (Fig. 1.b.). Adrenalectomy was carried out with a thermocauter. Peripheral effects of gonadotrophin and adrenaline used for eliciting sperm voiding

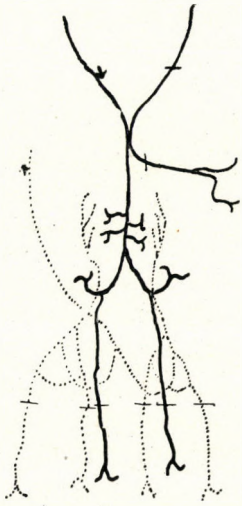


Fig. 2. Circulation scheme in the modified urogenital *Trendelenburg* apparatus. (For explanation see text)

were investigated by means of a modified urogenital *Läwen—Trendelenburg* preparation in which the cannula was inserted into one branch of the aorta while the others, the common intestinal and the internal and external iliac arteries, and the femoral and ischiadic veins were ligated : the outflow cannula was inserted into the abdominal vein. In this way the perfusion fluid reached only the urogenital apparatus, and the suprarenals could be excluded by previous cauterisation (Fig. 2.).

Rana esculenta was used for the experiments. Generally 20 I. U. of chorion gonadotrophin were administered, the lowest dose of which eliciting a positive test was found to be approximatively 5 I. U. for frogs of about 50 g weight. The experiments were carried out during the winter months at room temperature 16—20°C) on animals freshly brought from a cold environment.

Results

General observations. After the administration of 20—25 I. U. of chorion gonadotrophin (Pregnyl) spermia appeared after 0,5 to 1 hr. in frogs kept at both 18°C and 4°C. However, at the former temperature the intensity of the response declined rapidly within 10 hours and spermia disappeared completely after 24—36 hours, while at lower temperatures the maximal response was maintained in about two-thirds of the cases for as long as 40 hours and spermia could be found even after 50 hours.

The clasping reflex evoked by mechanical stimulation of the thenar, the inner surface of the forearms or the skin of the chest, usually appears somewhat earlier than spermia can be obtained, the difference not being significant. While even deep urethane or aether anaesthesia before, during, or immediately following, the injection did not inhibit either the voiding of sperm or the clasping reflex, it markedly lowered the motility of spermia. Curarization inhibited the response in the majority of cases. Extirpation of the forebrain, midbrain, decapitation, and destruction of the spinal cord, were also without marked effect on the appearance of spermia. The clasping reflex could be demonstrated in some decapitated animals also independently from hormone treatment. (Only typical prolonged tonic clasping responses were considered.)

Observations on brain potentials. Simultaneous oscillographic records using the procedure of *Ten Cate* (9) were taken from the forebrain, midbrain, and medulla as well as from the upper and lower parts of the spinal cord, partly with bipolar and partly with monopolar leads. The primary centre of the clasping activity being supposed to be located in the 1st and 2nd spinal segments, changes of action potentials could be expected to appear in those regions. The records were made after opening the skull and the spinal channel in urethane anaesthesia or on curarized frogs by means of a six channel inkwriting oscillograph of the *Kaiser* type. In 10 cases under a very light urethane anaesthesia (0,3 to 0,5 ml/50 g) it was also tried to stimulate the corresponding receptive fields and to record the resulting changes of central nervous activity. Although spontaneous changes of activity made an evaluation difficult, it may be stated that in 7 out of 10 cases a significant increase of electrical activity was observed in the midbrain leads corresponding to the hypothalamic level, while no characteristic change of activity was recorded from the spinal segments (Fig. 3.).

Effects on midbrain stimulation. The above observations called for investigating whether extrusion of spermia can be elicited by electrical stimulation of the hypothalamic region. This was carried out using small silver wire needle electrodes and by means of an impulse generator giving 1 Volt in 12 cycles per sec, the duration of each impulse being 1 msec. Stimulation lasted 1 to 1,5 hours. In 9 out of 20 animals, sperm cells appeared in the urine. The same could be observed sometimes following mechanical stimulation of the midbrain and simple insertion

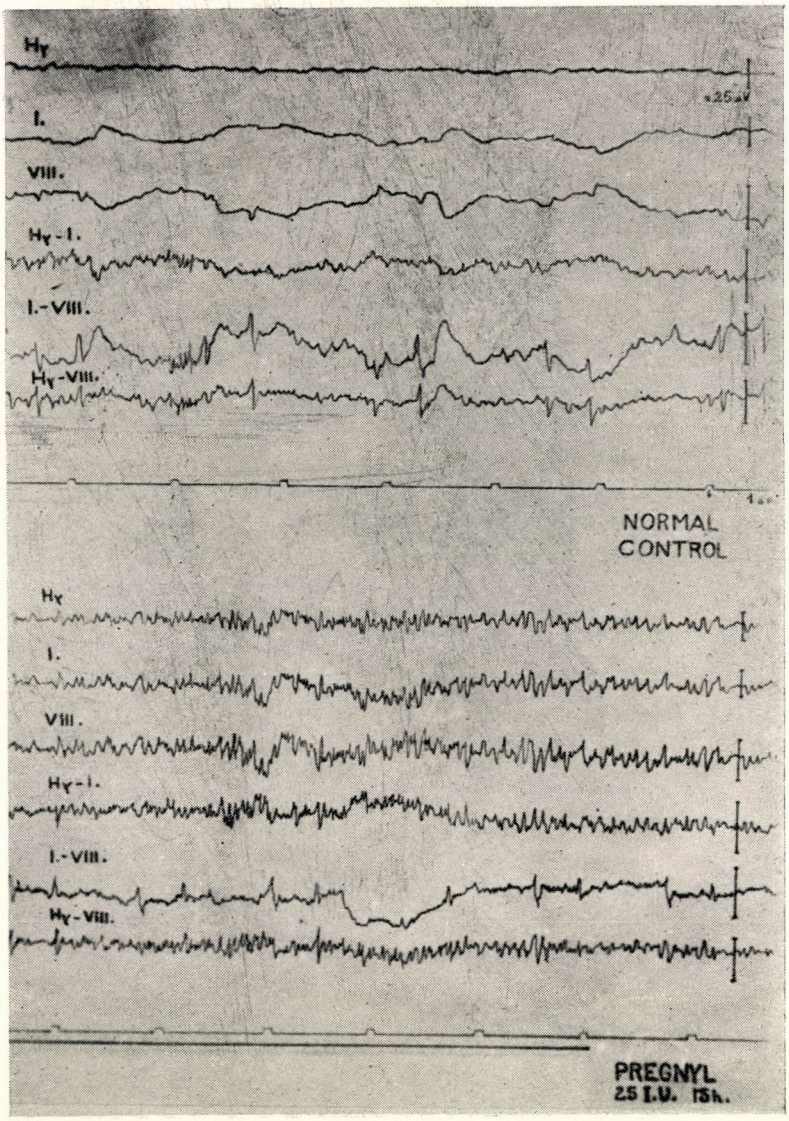


Fig. 3. Brain and spinal cord potentials of a frog before and 2 hours after Pregnyl treatment, during stimulation of receptive fields of the clasping reflex

of the electrodes without stimulation was followed by a positive reaction in 7 out of 20 animals. At the same time, mechanical or electrical stimulation of other parts of the nervous system or of the body was never followed by sperm voiding.

The clasping reflex which could never be elicited in the intact animal, appeared in a strengthened or even exaggerated form during and following hypothalamic stimulation.

Action of humoral mediators. Following injections of acetylcholine, neither »spontaneous« sperm extrusion was observed, nor could the clasping reflex be elicited. Large amounts (200—500 μ g/50 g) of the substance depressed reactions elicited by 20 I. U. of gonadothrophin.

After adrenaline injections, especially if they were repeated every hour, a positive sperm test was obtained almost in every case. This effect of adrenaline was described by *Robbins* and *Parker* (10) as well as by *Houssay* (11). As adrenaline exerts a similar effect on decapitated frogs the action of adrenaline and gonadotrophin on the isolated urogenital vascular system of the frog was also investigated. Injection of gonadotrophin or repeated addition of adrenaline to the perfusion fluid were followed by appearance of sperm cells in the frog's cloaca within 1 to 2 hours. The same effect was obtained with adrenaline in adrenalectomized animals. This observation, supporting the probability of a direct

TABLE I

CHGT hormone	Adrenaline	Operation	%+	Grade of reaction	Duration hrs.	N mber of cases
20 I. U.	—	—	100	5	24— 32	65
20 I. U.	—	& cooling	100	5	40— 50	10
5 I. U.	—	—	80	2—3	20— 28	20
3 I. U.	—	—	13	1	20— 28	26
—	—	el. hypoth. stim.	45	1—2	8— 16	20
—	—	hypoth. lesion	33	1—2	8— 16	20
—	0,04 mg.	—	55	1—2	—	38
—	—	hypophysectomy	54	2—4	30—300	48
3 I. U.	—	hypophysectomy	45	2—3	24— 50	24
—	0,04 mg.	hypophysectomy	75	2—4	16— 24	31
—	—	adrenalectomy	0	—	—	20
3 I. U.	—	adrenalectomy	0	—	—	15
20 I. U.	—	adrenalectomy	80	2—3	—	20
—	0,04 mg.	adrenalectomy	33	1—2	—	12

effect exerted by chorionic gonadotrophin on the testes, was further substantiated by the finding that the reaction to adrenaline and gonadotrophin disappears immediately after orchiectomy.

The clasping reflex could be elicited also by injections of adrenaline and was not eliminated by orchiectomy.

Role of pituitary gland and adrenals. Hypophysectomy was followed by intensive sperm production generally lasting through the whole period of the observation (up to 10 to 12 days in about 60 to 70 per cent of the cases). Hypophysectomized animals in which spontaneous spermatorrhoea had disappeared proved hypersensitive to choriongonadotrophin, positive tests being obtained with 2 to 3 I. U. (5 I. U. are considered generally to be the minimum effective

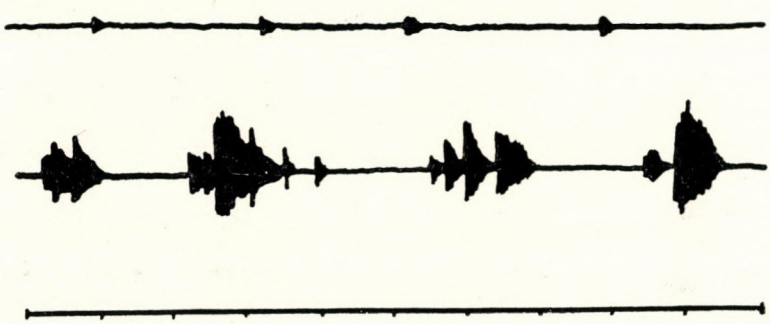


Fig. 4. Typical actogramme of a frog before and 2 days after hypophysectomy

dose for frogs of similar weight, i. e. 50 g). Table 1. demonstrates that the rise of sensitivity following extirpation of the pituitary shows a significant difference as compared with normals. In the control group consisting of frogs of lesser weight positive tests of grade 1. were obtained in 13 per cent.

A similar but less marked hypersensitivity to adrenaline was shown by hypophysectomized animals. The same sensitizing effect was observed in several cases after lesions of the midbrain.

The above effects are not abolished or substituted by adrenalectomy.

Following hypophysectomy, the intensity and duration of the clasping reflex is increased, the frog remains in the clasping state for several hours even in the absence of repeated adequate stimulation. The same phenomenon was occasionally observed following stimulation of the midbrain.

General motor activity. Considering that the motor activity of rats is increased in oestrus or following sexual hormone treatment and decreased after gonadectomy, (2) actographic observations were carried out on frogs. An increase of motor activity was observed only during the first days following hypophysectomy. Controls showed that the increase could not be due simply to the operational trauma (Fig. 4.). Administration of choriongonadotrophin had no effect on motor activity.

Discussion

The experiments prove the importance of both nervous and endocrine factors in the cyclic changes of sexual behaviour of the frog. Reflex and hormonal reactions are very closely associated at the hypothalamic level and even other factors, as adrenaline, may play a role in the reactions. There are data indicating that in lower vertebrates gonadotrophin may possibly be secreted also by the hypothalamus. Recent investigations of *Carlisle* (12) have demonstrated the gonadotrophic effect of neural gland extracts of Ascidia. *Marshall* and *Verney* (13), *Harris* (14), *Markee*, *Sawyer* and *Hollinshead* (15) showed that in the rabbit stimulation of certain parts of the hypothalamus, such as the pars infundibularis, tuber cinereum, are followed by ovulation, which otherwise could be elicited only by administration of pituitary gonadotrophin and adequate genital stimulation. No such effect was observed by stimulating the adenohypophysis. However, injection of adrenaline into the anterior lobe evokes ovulation which may be inhibited by sympatholytic agents and atropine.

The data presented seem to prove that beside the direct effects of gonadotrophin and adrenaline on the urogenital apparatus of the frog the normal sperm voiding and the reflex phenomena associated with the sexual cycle are under the control of a complicated neurohumoral mechanism involving the hypothalamo-hypophyseal system. Spontaneous prolonged spermatorrhoea, increased sensitivity to choriongonadotrophin, and increased intensity of the clasping reflex demonstrate that by hypophysectomy the voiding of sperm and the manifestation of specific sexual behaviour are released.

It may, therefore, be concluded that secretion of gonadotrophin is not indispensable for eliciting the above phenomena. This is further demonstrated by the observation that in hypophysectomized animals the clasping reflex can be elicited after midbrain stimulation independently from the sperm test. At the same time, the observations seem to indicate that in the normal frog the absence of the reactions during the major part of the year is due not only to a decreased secretion of gonadotrophin but also to pituitary function.

Summary

1. In the sexually inactive winter frog, hypophysectomy by itself produced spermatorrhoea and lowered the threshold of sensitivity to gonadotrophin.

2. Gonadotrophin in doses giving a positive Galli Mainini test elicits the clasping reflex.

3. Electric or mechanical stimulation of the hypothalamus may elicit voiding of sperm and the clasping reflex.

4. In the isolated urogenital apparatus, sperm extrusion is elicited by both gonadotrophin and adrenaline, independently from adrenalectomy.

5. Some inferences are drawn on neural and humoral factors involved in the sexual behaviour of the frog.

LITERATURE

1. *Pavlov, I. P.:* Experiences of twenty years in the objective study of higher nervous activity (behaviour) of animals. Biomedgiz (Moscow—Leningrad) 492, (1938).
2. *Munn, N. L.:* Handbook of Psychological Research, on the Rat. Cambridge, Mass. 66, (1950).
3. *Uchtomsky, A. A.:* Вестник эндокринологии **2**, **6**, (1928), Врачебная газета **2**, (1924).
4. *Pankratov, M. A.:* Тр. VII. Съезда физиол., биох. фарм. 192. Moscow, 1947.
5. *Galli Mainini:* Rev. Soc. Argent. Biol. **25** (5—6—7) 155, (1949).
6. *Bach, I., Szmuk, I., Klinger, B.* és *Róbert, L.:* Orvosi Hetilap X. 9. 264, (1949).
7. *Popova, N. K.:* Доклады АМН СССР **81**, 2. 317, (1952).
8. *Abderhalden, E.:* Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. a. V/3. b. 142. b. V/3. b. 152.
9. *Ten Cate, I.:* E. E. G. Clin. Neurophysiol. **2**, 445, (1950).
10. *Robbins, S. L., Parker, F. jr.:* Endocrinology **44**, 384, (1949).
11. *Houssay, B. A., Gerschman, R.* et *Ropela, D. E.:* Comptes Rendus de la Soc. Biol., 1227, (1950).
12. *Carlisle, D. B.:* Nature **166**, 737, (1950).
13 *Marshall, F. H. A., Verney, E. B.:* J. Physiol. **86**, 327, (1936).
14. *Harris, G. W.:* J. Physiol. **107**, 418, (1948).
15. *Markee, J. E., Sawyer, C. H., Hollinshead W. H.:* Endocrinology **38**, 345, (1946).

НЕЙРОГУМОРАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ ПОЛОВЫХ ФУНКЦИЙ ЛЯГУШЕК-САМЦОВ

А. Я. Андьян и З. П. Шош
Физиологический институт медицинского университета, г. Печ.

Резюме

1. Само только удаление гипофиза может вызывать сперматорею у зимних лягушек во время половой инактивности и снижает их чувствительность к влиянии гоиадорпина.

2. Гонадотропин в дозах, показывающих положительную Галли Маинини реакцию, обеспечивает вызываемость рефлекса обнимания.

3. Электрическое или механическое возбуждение гипоталамуса может вызывать выбрасывание семени и рефлекс обнимания.

4. Гонадотропин, как и адреналин, вызывают выбрасывание семени также и через изолированной сосудистой сети мочеполовой системы независимо от удаления надпочечной железы.

5. Авторы делают некоторые выводы относительно нейральних и гуморальних факторов, играющих роль в сексуальном поведении лягушек.

ELECTROPHYSIOLOGICAL ANALYSIS OF THE NATURAL CLASPING ACTIVITY OF FROGS

By

A. J. ÁNGYÁN, L. MENYHÁRT and J. SZABÓ

INSTITUTE PHYSIOLOGY, OF THE MEDICAL UNIVERSITY, PÉCS

(Received : 9, July 1952.)

The clasping reflex, first described and analyzed by *Goltz* (1), is one of the typical reflex reactions of the spinal frog. Its manifestation in the normal animal seems, however, to be restricted to males at the mating period, when it may readily be elicited by repeated stimulation of the ventral part of the forelegs and the skin of the chest. Natural clasping on the female may be maintained for as long as two days, the flexor muscle of the foreleg remaining highly tense. In that state the response of the animal to other stimuli, even painful ones, is markedly lowered.

Clasping seems to be one of the most prolonged tonic reflexes of vertebrate skeletal muscle. *Landois—Rosemann*'s textbook (2) states : »Von quergestreiften Muskeln geben die bei dem Umklammerungsreflex des Froschmännchens tätigen Muskeln der vorderen Gliedmassen das beste Beispiel einer physiologischen, Tage lang anhaltenden, offenbar keine Ermüdung verursachenden tonischen Zusammenziehung. Aktionsströme sind dabei während der ruhigen Dauerverkürzung nicht nachweisbar, sie treten aber auf, wenn durch sensible Reizung die Muskelzusammenziehung reflektorisch verstärkt wird.« The investigation into the otherwise well-known behaviour of muscle action currents seemed of interest, owing to the fact that the phenomenon consists of continuous changes from fast to tonic activity which may be amenable to experimental observation also under natural circumstances. The last edition of the textbook quoted states that in tonic contraction the muscle behaves as a lifeless elastic band. Under the influence of a stimulus it passes from one resting state to another by a change of elastic tension and the contracted state is maintained without work.

It was assumed that electrophysiological recording in the intact animal may elucidate at least some of the time factors of this mechanism.

Furthermore, clasping seems to be associated with definite changes in reflex integration. Hormonal factors, like testicle extracts (3) choriongonadotrophin and the hypothalamo-hypophyseal system may play a primary role in the phenomenon (4).

Our second aim was, therefore, to correlate changes of central nervous activity with the muscle phenomena observed during clasping.

Methods

Part of the experiments was carried out on winter frogs, in order to establish, whether the muscle action potentials really disappear during clasping tone, and to test the relative potency of 1. hypophysectomy, 2. gonadotrophin, 3. testosterone treatment, and 4. their combinations, in eliciting prolonged clasping reactions. For observing the effect of repeated stimulation, the first observations were made on unanaesthetized animals lying on their back and fixed to a desk by means of rubber bands. Needle electrodes were inserted at distances of less than 1 cm into the flexor muscles of the forelegs and the muscle potentials observed on the screen of a cathode-ray oscillograph. However, winter frogs (in which clasping was sustained by previous hormone treatment with Organon's Pregnyl, 20 to 50 I. U., or testosterone acetate 20 I. U., daily for several days) proved to be unsuited for detailed observations, for postural strain and mechanical trauma due to the electrodes often inhibited clasping or shortened its duration. Due to more vigorous clasping during the mating period, the difficulties became mostly eliminated in spring. During the mating period, most experiments were carried out partly on animals actually clasping the female and removed in that state from an open air basin, and partly on frogs in which clasping was elicited and maintained by a phantom of wet cotton-wool.

This procedure permitted simultaneous recording of hypothalamic activity be means of fine silver wire electrodes and of muscle potentials with a *Kaiser* ink-writing electroencephalograph. In several cases the recordings were repeated immediately after sectioning the brain at the supramedullar level, 2 mm behind the pituitary stalk. Comparative records were also taken from hypophysectomized frogs, the operation having been performed by means of an electric drill through a small trephine made hole on the parabasal bone. Recording was carried out either continuously or at intervals of 20 secs. to 1 min. using controlled and usually constant amplification.

Results

The normal clasping season of Rana esculenta lasts about 2—3 weeks in April and May. Male animals removed in this period from their natural environment and fixed by force on a desk, defend themselves violently until clasping is evoked by simultaneous friction of the skin on their chest and the inside of the forelegs. Defending reactions disappear with the development of the tonic clasping state. The same may be stated concerning the well known turnover reflex. »Natural«, »artificial«, and »phantom« clasping showed that »tonic« clasping could be maintained for a very long period (hours resp. days) only if repeated peripheral stimulation was ensured. This may originate from the proper receptive field of clasping, and arising either naturally from slight movements of the female,

or from stimulation of other receptors, even of those which otherwise evoke avoidance reactions, such as slight twitching of the hindleg. Therefore, clasping of the female lasts generally longer than clasping elicited by other methods.

An objective evaluation of the observations was attempted by plotting voltage, frequency against time. (Fig. 1. a., b.)

Typical records (Figs. 2., 3., 4., 5.) show also that in phantom clasping muscle spikes could be obtained even after 7 minutes whereas without the phantom they disappeared generally within 3 to 4 minutes.

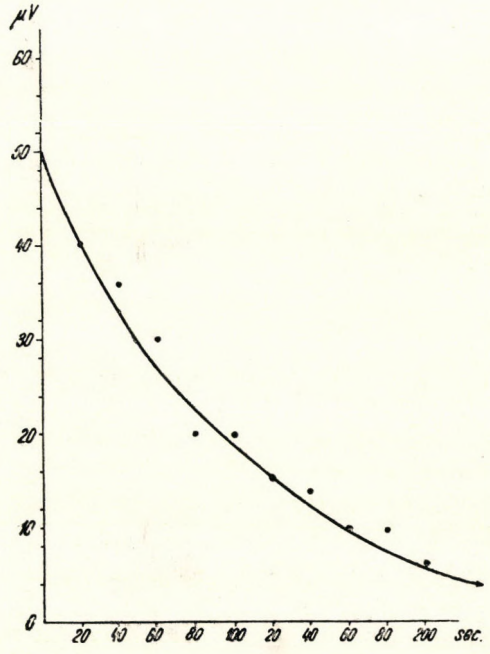


Fig. 1. a) Voltage decrease of the electric activity of foreleg flexors during natural clasping. Average curve from 20 cases

Hypophysectomy did not significantly shorten this muscle activity, but supramedullar section shortened the maintenance of the foreleg flexor's clasping tone and a faster decay of spikes was observed.

During clasping, contrarily to *Landois—Rosemann*'s above cited statement, electrical muscle activity does not seem to disappear entirely. It diminishes from 20 to 30 per sec and 25 to 50 micro-Volt to 0,1 to 2 per sec and 4 to 5 micro-Volt at about the 5th minute of clasping. The recording of the diminished spikes was naturally only possible by employing a relatively large amplification.

Stimulation of other receptive fields (Fig. 4. b., c.) was followed by a similar response of muscle activity as obtained by repetition of adequate stimulation.

Correlating muscle action potentials with hypothalamic activity, it may be stated that whereas in artificial clasping periodic spindles seemed to lessen or disappear and only small fast waves were seen on the hypothalamic recordings, in »phantom clasping« an initial depression coinciding with relatively frequent muscle rhythms, followed by a characteristic and increasing (7 to 10/sec) spindle activity could be observed. The typical spindles became more marked and dominant after each repetitive stimulation in spite of the somewhat faster decay of muscle spikes.

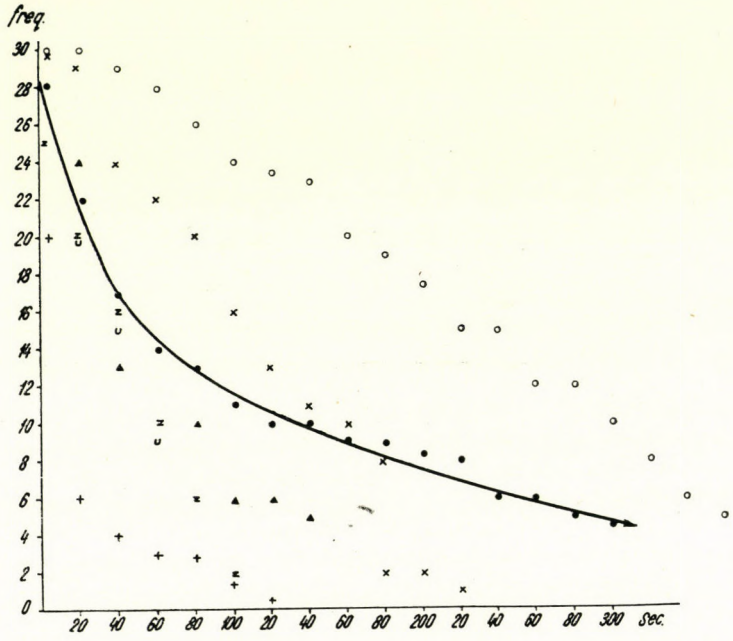


Fig. 1. b) Frequency decrease of muscle activity during natural clasping

Following hypophysectomy and supramedullar sectioning, no significant changes in hypothalamic action currents have been observed.

In addition it seems worth to mention that respiratory movements are suppressed, at the beginning of clasping, during the period of frequent muscle and depressed hypothalamic activity. The same is the case with periodic swallowing.

Discussion

It may be stated that, even during very prolonged clasping tone, action currents can always be obtained from the flexor muscles. This means that even that state of the striated muscle is maintained by small and infrequent impulses

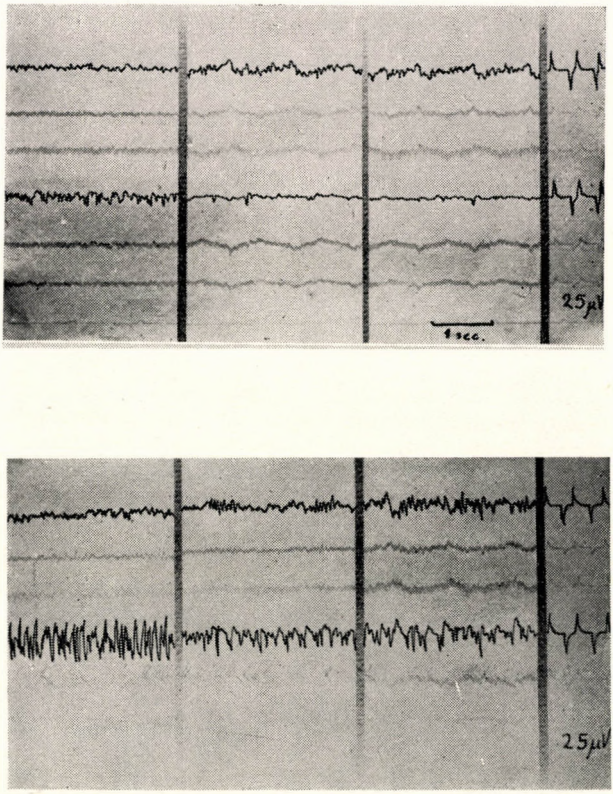


Fig. 2. Hypothalamic (above) and foreleg flexor muscle (below) action potentials during 1st, 2nd, and 3d minute of natural (phantom) clasping a = first clasping, b = clasping, elicited 30 minutes later, after complete disappearence of the first response

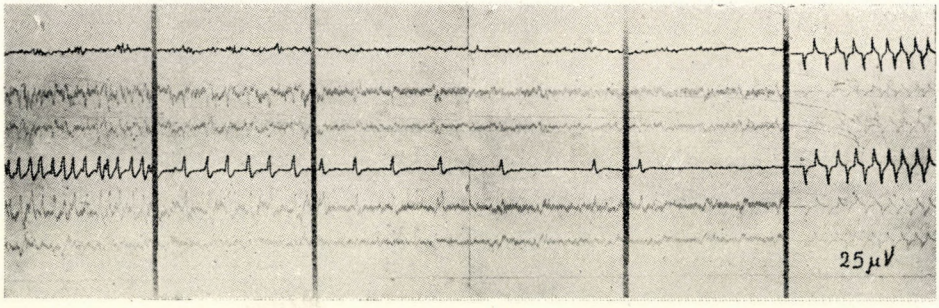


Fig. 3. Activity changes at the 10th, 30th, 60th, 120th, 200th and 360th secs of clasping (without phantome). Recording and time as in the preceding graph

which are probably of nervous origin. Therefore the »disappearance« of action currents reported by earlier authors may be attributable to the fact that muscle action currents had usually been recorded with an amplification lower than the one used by us.[1] On the other hand, intensity and frequency of muscle spikes do not correspond to the tone developed during prolonged clasping. Consequently, our observation may not be considered as contradictory to the »elastic

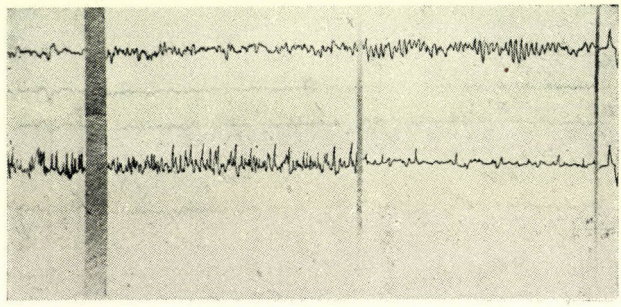


Fig. 4. a) Hypothalamic and foreleg flexor activity changes during natural clasping. 1. at the beginning, 2. 15th sec, 3. 200th sec.
Calibration deflection shows 25 V-s.

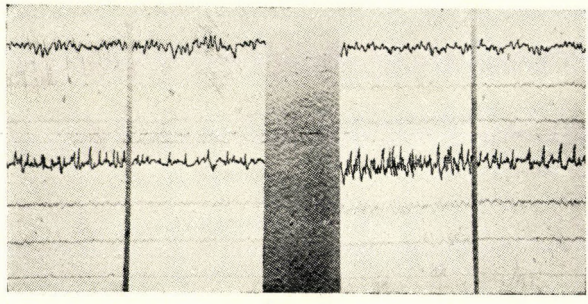


Fig. 4. b) light stroke on the hindlegs, 1. 280th sec., 2. 360th sec.
c) Pinching of the left hindleg. 1. 500th sec., 2. 560th sec.
Calibration, time scale, as on the previous recording.

band« (5), »rubber-crystallisation« (6), or other similar theories of tonic contraction. The same can be said of the rapid decrease of electric activity.

As mentioned above, peripheral impulses seem to be indispensable for the maintenance of prolonged tonic contraction. This alone, however, does not suffice to explain why natural clasping may last for several days. Facilitating influences from other receptive fields and suppression of other reflex activities, including escaping or avoidance reactions, seem to indicate a change in the central integration.

[1] String galvanometer recordings of clasping taken by *Lullies (7)* showed only large deflections, depending on the respiratory movements of the female.

The hypothalamic recordings support this assumption made first by *Tarkhanoff* (8).[1] That such a change in the central integration may be at least partly due to hormonal (humoral) factors is substantiated by the fact that hormones may elicit the appearance of the clasping response. A comparative study of hormonal factors had disclosed that testosterone is less effective in eliciting clasping than hypophysectomy combined with choriongonadotrophin treatment. Naturally,

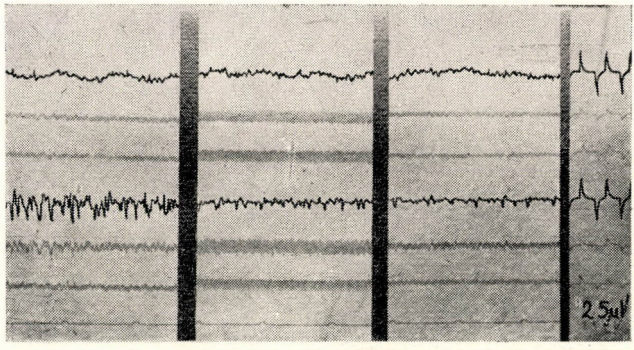
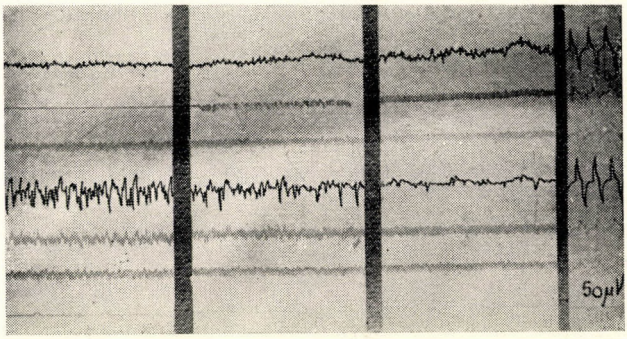


Fig. 5. a) Activity changes during clasping elicited on a hypophysectomized frog. (1st, 2nd, and 3d min.)



b) The same, following supramedullar section (20 minutes later.)

direct influences of humoral factors on muscles may also be taken into account. However, according to the above results the clasping tone is a centrally integrated and maintained reaction in which humoral factors may play an important, although secondary role.

[1] *Ufland (9)* employs Uchtowskys's term „dominant state" characterising this behaviour.

Summary

1. Muscle action currents of decreasing frequency and intensity could be recorded during prolonged tonic contraction of the flexor muscles of the mating male frog.

2. The tonic clasping is physiologically maintained by sensory impulses arising from very different receptive fields, while other reactions of the animal are suppressed.

3. Sensory impulses sustaining the clasping tone increase electrical activity of the hypothalamus after an initial depression. This effect is abolished by hypophysectomy or supramedullar sectioning of the brain.

4. The nature of prolonged tonic contraction of striated muscle is discussed.

LITERATURE

1. *Goltz:* Zbl. für Physiol. **24**, 2, (1909).
2. *Landois—Rosemann:* Lehrbuch der Physiologie. a. 22nd ed. Urban & Schwarzenberg, Berlin—Wien, 1942. 475, 588.
3. *Landois—Rosemann:* Lehrbuch der Physiologie. 26nd ed. 1950. 599. p.
4. *Ángyán, A. J.* and *Soós, Z. P.:* Acta Physiol. Hung. **4**,45 (1952.)
5. *Hill, A. V.:* Proc. Roy. Soc. Lond. B. **136**, 399 (1950).
6. *Ernst, E., Ladányi, G.* and *Tigyi, J.:* Acta Physiol. Hung. **2**, 4, 271, (1951).
7. *Lullies, H.:* Pfl. A. **241**, 486 (1926).
8. *Tarkhanoff:* — quoted by *Morin, G.:* Physiologie du Système Nerveux Central Masson & Cie., Paris, 1948. p. 206.
9. *Ufland, I. M.:* Pfl. A. **208**, 49 (1925).

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЕСТЕСТВЕННОЙ ОБНИМАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛЯГУШЕК

А. Я. Андьян, Л. Меньхарт и Я. Сабо

Физиологический институт медицинского университета, г. Печ

Р е з ю м е

1. Биотокки возбуждения мышцы уменьшающей частотой и интенсивностью были зарегистрированы на сгибательных мышцах у самцев лягушек во время длительного тонуса при обнимательном рефлексе.

2. Тоническое обнимание сохраняется физиологическим чувствительными импульсами, возникающими на весьма различных рецептивных полях, в то время как другие реакции животного подавлены.

3. После начальной депрессии, чувствительные импульсы, поддерживающие тоническое обнимание, повышают электрическую активность гипоталамуса. Этот эффект можно прекратить удалением гипофиза, или супрамедуллярным рассечением мозга.

4. Обсуждается природа длительного тонуса поперечнополосатой мышцы.

THE MECHANISM OF THE RISE IN 0_2-CONSUMPTION IN HYPERTHERMIA

By

SZ. DONHOFFER, GY. MESTYÁN, E. OBRINCSÁK—PAP, T. PAP and I. TÓTH

INSTITUTE OF PATHOPHYSIOLOGY, THE MEDICAL UNIVERSITY, PÉCS

(Received : 9, September 1952)

It is well known that O_2-consumption increases when the temperature of the environment exceeds the limit of the neutral zone and hyperthermia ensues (1). Using a gas chamber practically saturated with water vapour, normal rats respond with a rise of O_2-consumption to an ambient temperature of 35°C, many doing so already at 33°C. Recently it has been shown that some time after thyroidectomy, hypophysectomy, and in the course of prolonged methylthiouracil treatment, rats fail to respond to even higher temperatures with an increased metabolic rate, although their body temperature rises above the level which in the normal rat is invariably associated with a rise in O_2-consumption (2). This observation, being irreconcilable with the assumption that the increase of the metabolic rate in hyperthermia is simply a manifestation of van't Hoff's rule, indicated the involvement of a central nervous mechanism. Therefore an attempt has been made to investigate this point more directly by observing the effect of some drugs acting on the central nervous system and of bilateral electrolytic lesion of certain cerebral regions on the response of the metabolic rate to hyperthermia.

Methods

O_2-consumption of normal male rats was measured with the *Bellák—Illényi* apparatus (3) modified by *Balogh* (4), at an ambient temperature of 29°C and 35°C or more, before and after subcutaneous administration of diethylbarbiturate, phenylethylbarbiturate, urethane and chloralhydrate, and in animals in which bilateral electrolytic lesions were set with the *Horsley—Clarke* stereotaxic instrument. In many cases the response to environmental temperatures below the indifferent zone was also tested. At every temperature O_2-consumption was determined at least through three 15 min. periods and only those periods were evaluated in which no muscular activity was observed.

Results

a) *The effect of barbiturates, urethane and chloralhydrate*

Owing to the well known fact that thermoregulation is severely disturbed by adequate amounts of narcotic and hypnotic drugs, small doses had to be employed, which, at least in the majority of the rats, did not induce anaesthesia. Some of the rats were lying motionless on their side during the determination of O_2-consumption, but regained posture and were able to move when taken from the apparatus for measuring body temperature, while others retained a crouching posture throughout the experiment.

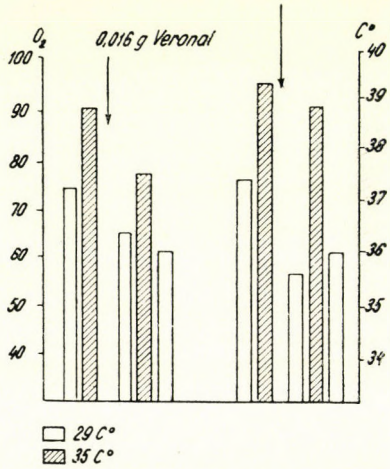


Fig. 1. Rat No. 197. ♂, 160 g. Date of experiment: Dec. 5, 1951. Left: O_2-consumption in ml per hour and dm^2 body surface. Right: body temperature.

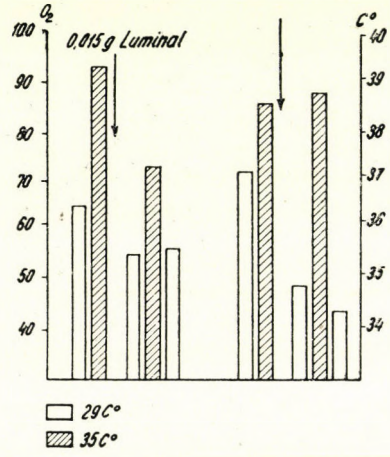


Fig. 2. Rat No. 195. ♂, 140 g. Date of experiment: Dec. 4, 1951. Left: O_2-consumption in ml per hour and dm^2 body surface. Right: body temperature.

Subcutaneous administration of 0,01 g of diethylbarbiturate or phenylethylbarbiturate per 100 g of body weight, failed to inhibit the rise in O_2-consumption in an environment of 35°C, although the values reached were usually lower than those recorded before administration of the drug. The fact, that barbiturates even in the small doses administered tend to lower temperature and O_2-consumption in an environment of indifferent temperature, indicates that no undue weight should be attributed to the difference. Fig. 1. and 2. are typical examples of the eight experiments performed.

Urethane in doses of 0,09 g per 100 g body weight completely eliminated the energetic response to an environment of 35°C in 14 out of 17 experiments, and reduced the rise significantly in the other three. At indifferent temperature

(29°C), O_2-consumption and body temperature were, in agreement with *Issekutz*' observations (5) either not affected by urethane, or in all but two instances only slightly reduced. The usually transient and moderate rise in O_2-consumption, quite frequently appearing immediately after the administration of urethane, may be disregarded in this respect. Fig. 3. and 4. are typical for the effect of urethane.

Essentially similar results were obtained with 0,025 to 0,05 g of chloralhydrate per 100 g body weight, though the depressing effect on O_2-consumption at 29°C was more often encountered than in the case of urethane. Fig. 5. and 6. are representative.

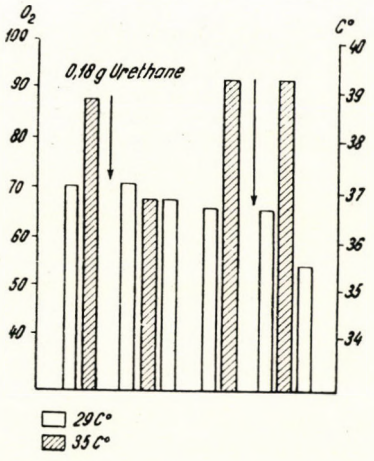


Fig. 3. Rat No. 192. ♂, 200 g. Date of experiment: Dec. 22, 1951. Left: O_2-consumption in mlper hour and dm^2 body surface. Right: body temperature.

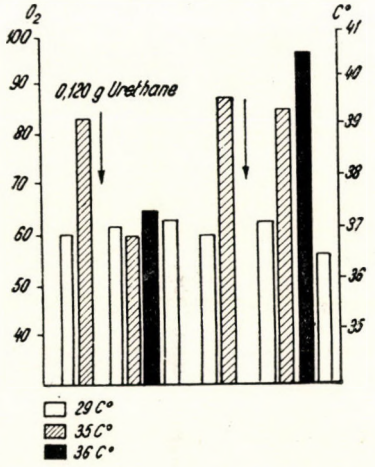


Fig. 4. Rat No. 183. ♂, 135 g. Date of experiment Dec. 12, 1951. Left: O_2-consumption in ml per hour and dm^2 body surface. Right: body temperature:

Similar doses of urethane and chloralhydrate failed to inhibit the energetic response to ambient temperatures below the indifferent zone.

b) *The effect of bilateral electrolytic lesions*

In the course of an extensive investigation into the effect of bilateral lesions of the hypothalamus and adjacent regions, 29 rats failed to respond with a rise in O_2-consumption to high environmental temperatures associated with marked hyperthermia. Three of these are reported in some detail.

Rat No. 492. ♂, 140 g. Bilateral electrolytic lesion on Jan. 17., 1952. Experiment on Jan. 19, 1952. Sacrificed on Feb. 29, 1952, weighing 180 g. Bilateral lesion at the middle level of the tuberal region involving the dorso-

medial hypothalamic nucleus and the lateral hypothalamic area on one side and the dorsal part of the same area on the other. Haemorrhage into the third ventricle.

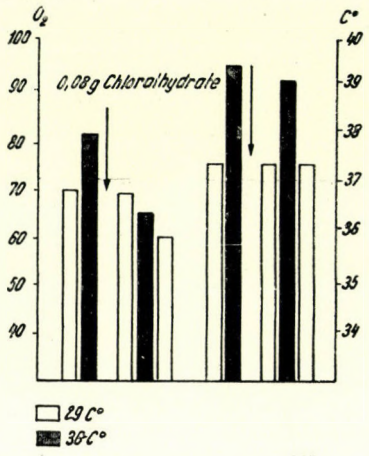


Fig. 5. Rat No. 214. ♂, 210 g. Date of experiment July 29, 1952. Left : O_2-consumption in ml per hour and dm^2 body surface. Right: body temperature

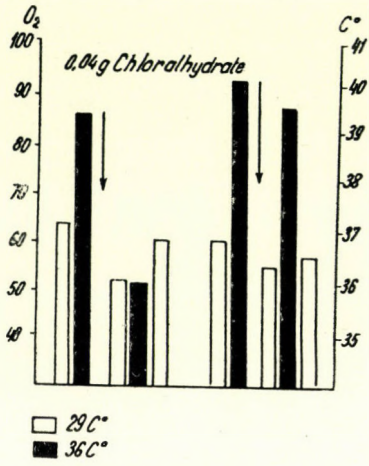


Fig. 6. Rat No. 219. ♂, 115 g.Date of experiment Aug. 7, 1952. Left : O_2-consumption in ml per hour and dm^2 body surface. Right : body temperature

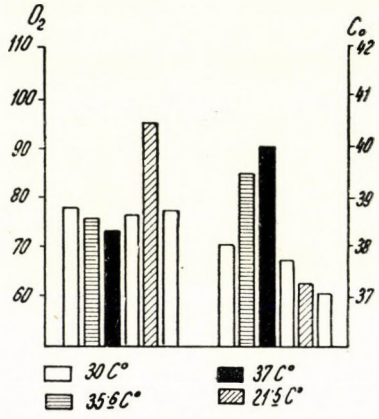


Fig. 7. Rat No. 492. Left : O_2-consumption in ml per hour and dm^2 body surface. Right: body temperature

Fig. 7. demonstrates clearly that following the lesion, the response of O_2-consumption to an environment of 35°C, and even 37°C, has been completely abolished, although hyperthermia of 40°C ensued. It may be observed that there was no gross disturbance of thermoregulation and that the response of the

metabolic rate to temperatures below the indifferent zone remained unimpaired. Seven similar tests performed until Feb. 4, 1952. gave identical results.

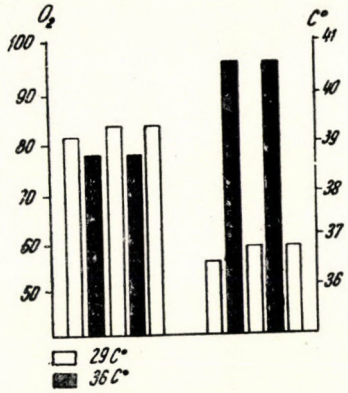


Fig. 8. Rat No. 526. Left : O_2-consumption in ml per hour and dm^2 body surface. Right : body temperature

Rat No. 526. ♂, 130 g. Bilateral electrolytic lesion on June 24, 1952. Experiment on June 28, 1952. Sacrificed on July 19, 1952, weighing 115 g. Bilateral symmetric lesions of the size of a pinhead in the region of the trigonum habenulae involving also the posterior central part of the lateral ventricle.

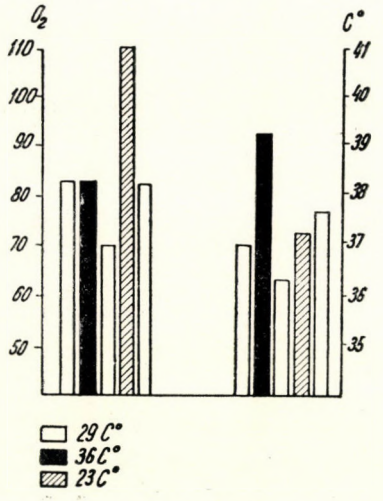


Fig. 9. Rat No. 509. Left : O_2-consumption in ml per hour and dm^2 body surface. Right : body temperature

Fig. 8. shows the absence of an increase of O_2-consumption, though body temperature reached 40,5°C in an environment of 36°C. Identical results were obtained in six similar tests performed on the same animal between June 25,

and July 1, 1952. No gross disturbance of thermoregulation was observed and the energetic response to cool temperatures (23°C) was not impaired.

Rat No. 509. ♂, 155 g. Bilateral electrolytic lesion on May 26, 1952. Experiment on May 30, 1952. Sacrificed on July 2, 1952. Large symmetrical lesions extending from the anterior part of the tuberal region to the middle of the mamillary region and dorsally extending to the trigonum habenulae.

Fig. 9. demonstrates an essentially similar result as Figs. 7. and 8. There was no response of O_2-consumption in an environment of 36°C in spite of marked hyperthermia, while the response to a cooler ambient temperature (23°C) was unimpaired and no gross abnormality of thermoregulation was present. An identical result had been obtained on the same animal two days earlier. It may be of interest that the phenomenon of the »second chemical regulation« appeared, i. e. both O_2-consumption and body temperature at indifferent temperature were lower after than before exposure to high temperature.

Discussion and summary

The fact, that the rise in O_2-consumption invariably appearing in the normal rat during exposure to high temperatures, can be abolished by administration of urethane and chloralhydrate or by bilateral electrolytic lesion of certain regions of the brain, makes it evident that the response is due to a central nervous mechanism and confirms the conclusion drawn from earlier experiments on thyroidectomized, hypophysectomized and thiouracil treated rats, according to which the increase of the metabolic rate cannot be attributed to the operation of van't Hoff's rule.

A clear-cut evidence for the central nervous origin does, however, not yet prove the assumption proposed as an alternative to van't Hoff's rule, i. e. that the rise in O_2-consumption during hyperthermia is due to the increased O_2 demand of the mechanisms of heat loss (increase of minute volume, panting, etc.). In other words, the thermoregulatory significance of the rise in O_2-consumption in hyperthermia awaits further investigation and will be dealt with in another communication.

The observation, that lesions abolishing the energetic response to hyperthermia are not associated with marked thermoregulatory disturbance and do not impair the response of O_2-consumption to temperatures below the indifferent zone, indicates the complexity of interrelations of the central nervous mechanisms regulating and coordinating thermoregulatory and metabolic responses.

Our thanks are due to *J. Szentágothai* and *B. Mess* for the histological examination of the brains.

LITERATURE

1. *Rubner, M.:* Die Gesetze des Energiewechsels bei der Ernährung. F. Deuticke, Leipzig und Wien, 1902. p. 138.
2. *Balogh, L., Donhoffer, Sz., Mestyán, Gy., Pap, T.* and *Tóth, I.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 367, 395 (1952).
3. *Belák, S.* and *Illényi, A.:* Biochem. Zeitschr. **281**, 27, (1935).
4. *Balogh, L.:* Experientia, **7**, 68, (1951).
5. *Issekutz, B. sen.:* Personal communication.

МЕХАНИЗМ ПОВЫШЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА, СВЯЗАННОГО С ГИПЕРТЕРМИЕЙ

С. Донгоффер, Д. Мештьян, Е. Обринчак-Пап, Т. Пап и И. Тот

Патологический институт медицинского университета, г. Печ.

Р е з ю м е

У крыс дозами уретана и хлоралгидрата, не вызывающими наркоза, а также и некоторыми повреждениями в области гипоталамуса, можно препятствовать повышению энергетического обмена, вызванного сопровожденной гипертермией высокой окружающей температурой. В то же время, при окружающей температуре ниже нейтральной, повышение энергетического обмена происходит неизменно, и в теплорегуляции не наблюдается большое выпадение. Следовательно, повышение энергетического обмена, связанного с гипертермией, не основывается на общем повышении скорости реакции по закону вант Гоффа, а на механизме центральной нервной системы.

CENTRAL REGULATION OF THE ADRENALINE-INDUCED INCREASE IN METABOLIC RATE

By

A. K. PFEIFER, I. PATAKY and M. FORBÁTH

INSTITUTE OF PHARMACOLOGY OF THE MEDICAL UNIVERSITY, BUDAPEST

(Received: 12, August 1952)

Since *La Franca* (1) in dogs, *Abelin* (2) and later *Cori* and *Cori* (3) in rats, *Fuchs* and *Roth*, as well as *Bernstein* (4, 5) in the man, *Issekutz* sen. and *Harangozó—Oroszy* (6) in rats anaesthetized with urethane had demonstrated that adrenaline caused an increase in oxygen consumption, the view that this effect on metabolism was peripheral in origin has been generally accepted. A participation of the central nervous system in the phenomenon seemed to be excluded as *Adler* (7), following destruction of the thermic centre and transsection of the first cervical segment, *Freund* and *Grafe* (8), following transection of the cervical medulla, and *Issekutz* sen. (9), following decapitation, and deep sevenal (phenylaethyl barbituric acid) anaesthesia were able to increase the metabolic rate by administration of adrenaline. Their view was further confirmed by the observation of *Yamakita* (10) who found the oxygen consumption of the brain unchanged following intravenous infusion of adrenaline. In some animals even a decrease could be observed in spite of the fact that in the course of the experiment the blood supply to the brain was raised owing to the dilatation of cerebral vessels. In a similar intravenous experiment, *Boothby* and *Sandiford* (11) demonstrated a 40 per cent increase in the metabolic rate of the whole animal. Although more recent experiments (*Issekutz* jun.) have revealed the central effects of adrenaline, it still appears probable that the central nervous system, or, precisely, the mesenphalic vegetative centres do not participate in the increasing of the metabolic rate, at least not to an extent demonstrable by usual methods. Adrenaline produces the phenomenon by acting directly on the cells, as it has been proved by numerous experiments carried out on isolated organs and cell suspensions (13, 14). The problem how the metabolic effect of adrenaline becomes inoperative is not quite clear. The duration of its action depends on the species of test animal and on the dose used. In experiments on rats, subcutaneous administration of 0,1 to 0,05 mg of adrenaline per 100 g of body weight brought about an increase in the metabolic rate lasting 3 to 4 hours. The difference between various doses presented itself less in the degree of increase than in prolongation of the action. Comparing the duration of the metabolic action to other effects

elicited by similar doses of adrenaline, these last somewhat longer than the metabolic action (16), e. g. hyperglycaemia with about one hour (15), the spasm of subcutaneous vessels with an average of 3 to 4 hours (16). *Blaschko* (17) could obtain active adrenaline from haemolyzed red cells after a period as long as 10 hours. According to *Richter* and *Tingey* (18), the action of liver amino-oxidase is so slow that it could inactivate only an insignificant part of the adrenaline present in normal circulation. The above data, together with the fact that the rise in the metabolic rate induced by adrenaline lasts only about 3 to 4 hours, make it justified to assume that the relatively short duration of the action cannot be explained simply by the transformation, disintegration or excretion of adrenaline. It seems that some kind of a counter-regulatory activity *(Went)*, inhibiting any further increase of the metabolic rate of cells in spite of the presence of intact adrenaline molecules, should be taken into consideration. Investigation into this mechanism was the aim of the present study.

Methods

Albino rats were used for the experiments. The metabolic action of adrenaline was estimated at a temperature of 29° C with a method described in a previous paper (19). The basal metabolic rate was calculated from the mean of three consecutive periods, with readings taken every five minutes, presuming that the differences of single readings did not exceed 5 per cent. Adrenaline (Tonogen, Richter) and anaesthetics were administered subcutaneously. Their concentration was invariably prepared in a manner that 0,5 ml of fluid should be injected for every 100 g of body weight. The effect of adrenaline was considered to have ceased in the 30 minutes period in which the mean of the six 5 minutes readings reached the level of the basic metabolic rate or fell into the plus 10 per cent margin. Four animals were always tested simultaneously with four apparatuses in the same water bath. In each experiment at least one animal served for control.

Removal of the cerebral cortex was carried out in ether anaesthesia, according to the method of *Amsler* (20). One group of the decorticated animals was tested 48 hours, another group two weeks, following operation. Since the metabolic action of adrenaline was the same in both groups, no separate table was constructed to show the results. The behaviour of animals with chronic decortication was in complete accordance with the description of *Bayandurov* (21), although the animals never became voracious. It was rather their spontaneity the animals have lost. They did not wash themselves, most of them would eat only after their nose had bean thrust into the food or if a mouthful of food was forced between the teeth.

In the first experiment, rats were given 0,1 mg/100 g of adrenaline after their basal metabolic rate had been determined and the increase in oxygen

consumption was measured until it had not returned to, or approached with 10 per cent the basal value. Then another dose of 0,1 mg of adrenaline per 100 g weight was administered into an area other than the first one, and the duration of the action was determined. As it is clearly shown in Fig. 1., in normal, awake animals both the duration and the magnitude of the increase of metabolic rate brought about by the second dose of adrenaline were invariably shorter resp. smaller than following the first dose. The phenomenon merits attention, because according to *Auer* and *Meltzer*'s results, as well as to those of *Braun*, *Ritter*, *Fornet*, *Patta* and others, it could be taken for granted that the first dose of adrenaline could not have been completely absorbed at the time when the second dose was administered. Consequently, after the second injection there must have been more adrenaline in the animal than after the first one. The simplest explanation of the contradiction appears to be that the first rise of about four hours' duration in the metabolic rate had »exhausted« the animal and that that is why the response to the second dose of adrenaline was less marked. This superficial explanation, however, is the less satisfactory, since it is a well known fact that following administration of thyroxine there may occur a 50 to 70 per cent rise in the metabolic rate which lasts for several days and is still well tolerated by the animals. It has been assumed that the effect of the first dose had been abolished by some counter-regulating mechanism and thus the second dose reached the animal in a certain »refractory« state. The process discussed being an increase in the metabolic rate, it might be supposed that its counter-regulation is being directed from the mesencephalon. In the next series of experiments we therefore observed the effect of two consecutive doses of adrenaline on the behaviour of animals in which the mesencephalon had been inhibited by sevenal. In preliminary experiments it has been found that 10 mg/100 g of sevenal sodium produced a deep narcosis anaesthesia), corresponding to Grade IV. of the classical postural method for 6 hours, during which period the metabolism of one group of the animals remained unchanged, while the rest showed a decrease of 10 to 15 per cent. Simultaneous administration of adrenaline reduced the duration of sleep with an average of 1 hour. However, a prolongation of the sleep with 4 to 5 hours may be induced by a further dose 3 mg/100 g of sevenal, without causing any substantial change in the shape of the metabolic curve. Bearing these in mind, the second series of experiments have been set up in the following ways. The basic metabolism of animals treated with 10 mg/100 g of sevenal was determined in three periods of 30 minutes each, then 0,1 mg/100 g of adrenaline was injected subcutaneously and the consequential rise of the metabolic rate was determined. Administration of 3 mg/100 g of sevenal was repeated five and nine hours after the first dose had been given. The procedure ensured a constant depth of narcosis throughout the whole experiment. As in the first series of observations, the second dose of adrenaline was administered at the time when the increase produced by the

first dose had returned to normal or had been reduced to+10 per cent. As can be seen from Fig. 1. and Table I., the sevenal increased the height and especially the duration of the rise in the metabolic rate. While in the control animals the effect of the first dose of adrenaline lasted 4,5 hours and that of the second one 3,5 hours, i. e. a total of 8 hours for the two doses, in the group treated with sevenal the first dose of adrenaline acted for 7 hours, the second for 5,5 hours, the total duration of action having been 12,5 hours. The peak of metabolic rates was also about 20 per cent higher in the group treated with sevenal than in the control group. The shape of the metabolic curves did, however, show no signi-

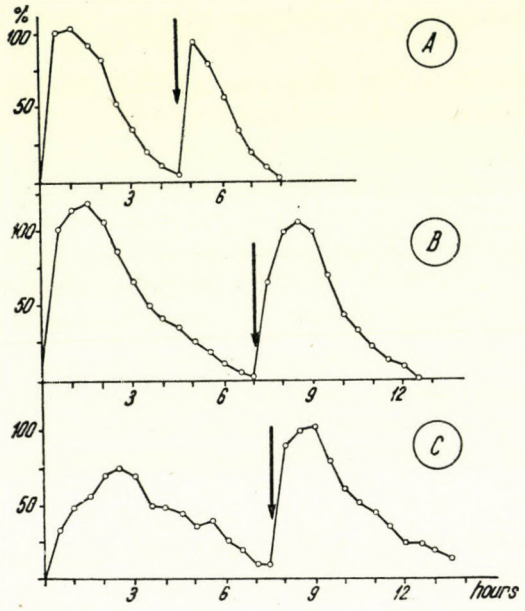


Fig. 1.

Increase (in per cents) in the metabolic rate, induced by two injections of 0,1 mg/100 g of adrenaline each (average of 10 animals).

A=control animals, B=group treated with 10 mg/100 g of Sevenal, C=group treated with 3 mg/100 g of morphine and 0,1 mg/100 g of scopolamine.
The arrow indicates the injection of the second 0,1 mg/100 g dose of adrenalin.

ficant change. The rise following the second dose of adrenaline in this group was also lower and of a shorter duration than after the first dose. It seems as if by elimination of the mesencephalic centres the counter-regulating activity could be markedly diminished, as the effect of the first dose of adrenaline was prolonged but not completely abolished, and the second dose still had an effect, though a less marked one. In connection with the experiments the objection might be raised that inpart of the animals the metabolic rate had already been reduced by the sevenal and thus the increase of metabolic rate produced by

adrenaline was of the same degree than in normal animals, only started from a lower level. If this were true, i. e. if adrenaline, »disregarding« the depression produced by sevenal, would bring about a similar increase in the metabolic rate of treated animals as if this would have started from a normal level, and if that fact were responsible for the 10 to 20 per cent higher rise, nothing could explain why the duration of adrenaline action would be prolonged with about 4,5 hours by the 10 to 15 per cent depression caused by sevenal. The fact, however, that in the great majority of the animals sevenal did not depress the metabolic rate and these animals produced the same metabolic curves with the same absolute values, as did those starting from a lower level, offers decisive proof.

Issekutz jun. et al (22), when determining the site of action of thyroxine and actedron, have successfully used a morphine-scopolamine combination for blocking vegetative centres. The combination, acting through at least two sites upon the central nervous system of animals, seemed to offer certain advantages in further investigations. Scopolamine exerts on the mesencephalon a blocking action similar to that of sevenal. Morphine, on the other hand, blocks the cortex. A simultaneous dose of 0,1 mg/100 g of scopolamine and 3 mg/100 g of morphine is capable of inhibiting the metabolism-increasing action of thyroxine, actedron, or ephedrine, and, at the same time, it either does not influence the normal metabolism of the animal, or at most produces a 10 per cent decrease. The effect lasts about 8 hours. In a new series of experiments, — similarly to those performed with sevenal, a morphine-scopolamine anaesthesia was induced and the metabolic rate determined : subsequently, after two intervals of six hours each, 0,05 mg/100 g of scopolamine and 0,05 mg/100 g of morphine were twice injected into the animals. Dosage and mode of administration of adrenaline were identical with those in previous experiments.

The most striking feature in Fig. 1., but especially in Table I., is the changed shape of the metabolic curves. The elevations of the metabolic rate produced by the first and second doses of adrenaline last for similar lengths of time, and, a phenomenon even more striking, the percentual rise produced by the second dose of adrenaline surpasses that of the first. The increase in metabolic rate elicited by the common effect of the two doses of adrenaline lasts six hours longer than in the control animals. The difference between the two groups is especially obvious in Table I. The combined percentual value and duration of the increase in metabolic rate may be best expressed in so-called plus-calories liberated by adrenaline, i. e. in the amount of heat in gramme-calories produced by the animal in excess of its normal metabolic rate during the total course of adrenaline action. In contrast to the 1719 calories of the control group, the sevenal group produced 2792 calories, the morphine-scopolamine group 3035 calories, on identical doses of adrenaline.

Comparing the results in the sevenal group with those of the morphine-scopolamine experiments, it may be stated that the duration of adrenaline

effect was markedly prolonged in both. A substantial difference between the two groups consists in the fact that in the morphine-scopolamine group the second dose of adrenaline was more efficient than the first. The fundamental difference in the sites of action of the two anaesthetics used is probably due to the marked decreasing effect of morphine on the excitability of the cortex. It might be assumed, therefore, that the qualitative alteration in the shape of the curves was due to blocking of the cortex.

Although the results are in no way opposed to data hitherto published in the literature, certain objections might still be raised as to the validity of the experiments, viz. on the one hand, that the localisation of the site of action of the drugs used was not an exclusive one, i. e. the agents may have acted also in other areas of the central nervous system, and, on the other hand, that there may have occurred some unknown side effects due to which the absorption of adrenaline might have improved, the sensitivity of cells to adrenaline altered, the rate of elimination decreased, etc. Taking these problems into consideration, experimental conditions have been changed in the following way. After determining the basal metabolic rate, the animals were given 0,05 mg/100 g of adrenaline and the increase in metabolic rate was continuously controlled until this had decreased to 50 per cent of the maximal value reached. At that time — on the average 2,5 hours following administration of adrenaline, when the effect of the drug was just about to cease — the animal was given morphine or chloralhydrate in a dose (2 to 3 mg/100 g of morphine, or 10 mg/100 g of chloralhydrate) which, according to the literature, blocks exclusively the cerebral cortex. The determination of metabolic rates was then continued until values had ceased to increase. As seen in Fig. 2. A, the shape of the curve undergoes a change following cortical blockade. The metabolic rate then continues to decrease for 30 minutes, partly because the morphine or chloral has not been completely absorbed and partly because either of the two drugs is capable of reducing the metabolic rate with an average of 10 per cent. In the next 30 minutes period, however, there occurs a marked elevation terminating six hours later. Comparing this curve with those of animals that received similar amount of adrenaline after they had been given at the beginning of the experiment a cortical blocking agent, it will be seen that the duration of metabolic increase was equal in both experiments. Although it has been shown in numerous reliable observations that, in the dosage applied, the two drugs used perform a so-called chemical decortication, i. e. they exert their action exclusively by means of cortical blockade, surgical methods were also applied by us for determining the site of action of the centre of counter-regulation.

It has been found that, following removal of the cerebral cortex of adult rats by the method described above, sensitivity to adrenaline was increased. The usual dose of 0,1 mg/100 g proved lethal in 50 per cent. Therefore the experiments were carried out with the smaller dose of 0,05 mg/100 g, which had been

TABLE I

Plus-calories per 100 square centimeters liberated by adrenaline

Weight g	Adrenaline	Drug	First dose	Second dose	Difference %	Total
100	0,1 mg	—	1241	708	—43	1949
95	«	—	1004	560	—44	1564
110	«	—	1204	447	—63	1651
115	«	—	1420	510	—64	1930
115	«	—	1199	769	—32	1968
95	«	—	813	332	—59	1145
140	«	—	904	372	—59	1276
140	«	—	1249	631	—50	1880
160	«	—	1156	726	—37	1882
180	«	—	1157	789	—32	1946
Average			1135	584	—48	1719

TABLE II

115	0,1 mg	3 mg Mo 0,1 mg Scop.	1748	1830	5	3578
110	«	«	1300	1326	—	2626
105	«	«	1172	1735	48	2907
135	«	«	1191	1746	46	2937
140	«	«	1072	1863	72	2955
110	«	«	1712	1104	—35	2816
110	«	«	1815	1532	—15	3347
160	«	«	1820	1970	8	3790
150	«	«	1276	1413	10	2689
125	«	«	1326	1380	—	2706
Average			1443	1590	10	3035

TABLE III

155	0,1 mg	10 mg Sevenal	2048	1581	—22	3629
135	«	«	2096	1184	—44	3277
150	«	«	1232	1600	30	2832
140	«	«	1572	1376	—13	2948
125	«	«	1355	1022	—25	2377
130	«	«	1482	631	—59	2113
110	«	«	1759	622	—65	2381
105	«	«	1886	1242	—35	3128
105	«	«	1504	1098	—27	2602
130	«	«	1654	980	—41	2634
Average			1659	1134	—33	2792

$$S_1 = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\sigma^2_{M_1} + \sigma^2_{M_2}}} = 11{,}2 \qquad S_2 = 6{,}7$$

used previously for determining the action on the metabolic rate of three consecutive injections. As it may be seen in Fig. 3., the results obtained fulfilled expectations. The elevations of metabolic curves continuously decreased both in duration and height. It was striking, and, in our opinion, one of the proofs of the existence of counter-regulations, that the action of doses of 0,05 mg and 0,1 mg lasted for about the same lenght of time and differed only in the height of increase caused. The basal metabolic rate of decorticated animals is usually identical with that of normal ones. In the group tested 48 hours following operation, some animals had basal rates 20 to 30 per cent lower than normal. These

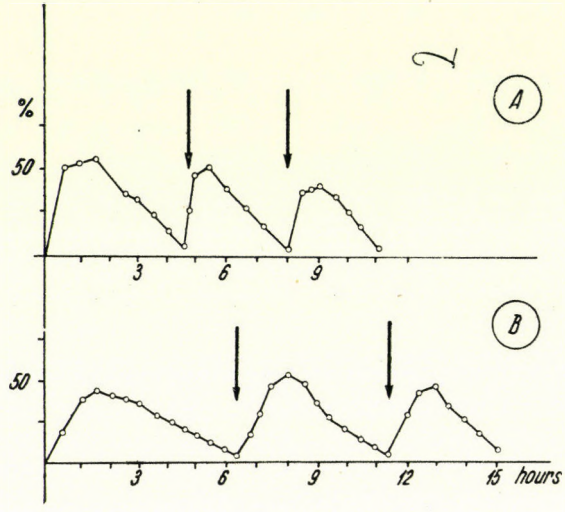


Fig. 2.

Increase (in per cents) in metabolic rate, induced by 0,05 mg/100g of adrenaline (average of 10 animals). A=normal animals to which 5 mg/100 g of morphine was administered at the time indicated by the arrow. B=control group that received similar amounts of morphine prior to the administration of adrenaline

animals, all of which tolerated the operation badly and could not stand up 24 hours later, were removed. As already mentioned in the introduction, no voracity was present in our animals. The majority did not even eat spontaneously, not without having their nose thrust into the food. *Bayandurov* observed the same behaviour in animals which had suffered a minimal injury of the striate body at operation. Considering that in our experiments the most complete removal of the cortex formed a principal aim and, further, that the Soviet author observed no differences between the weight curves of animals with and without striate injury, in our experiments a minimal injury to the striate body seemed admissible.

In the decorticated animals the curve of metabolic increase obtained following administration of 0,05 mg/100 g of adrenaline was similar to those observed in the morphine-scopolamine group. The first dose produced an elev-

TABLE IV

Plus-calories per 100 square centimeters produced by 0,05 mg/100 g of adrenaline.

Weight g	First dose	Second dose	Difference %	Third dose	Difference %	Total calories
Control animals						
125	555	787	—54	365	—48	1207
145	634	332	—53	55	—91	1021
180	411	181	—56	48	—88	640
185	486	335	—35	—	—	821
180	609	227	—63	252	—59	1088
160	914	528	—42	302	—67	1744
135	612	401	—34	177	—71	1190
100	494	606	23	206	—58	1302
105	574	338	—41	257	—55	1169
195	428	325	—24	228	—47	981
Average	572	356	—48	189	—67	1117
Decorticated animals						
135	612	676	9	570	11	1758
135*	232	233	—	512	120	977
110	680	662	—	568	—17	1910
175	1068	883	—18	341	—68	2292
150	946	613	—35	424	—55	1983
190	1053	736	—30	725	—30	2514
170	738	690	—7	679	—8	2107
110	596	670	12	550	—8	1816
110	1048	1116	6	392	—72	2556
90	1090	1090	—	680	—38	2860
Average	870	792	—7	547	—35	2199

Control animals

Decorticated animals

* At autopsy both hemispheres markedly softened, thalamus not intact. Values of this experiment have not been included in the mean.

$S = 5 \cdot 8$

ation somewhat lower and more prolonged than in the controls. After the second dose the increase was higher but of shorter duration than the first one. The elevation brought about by the third dose was on the average 30 per cent lower than the first, while in the control group a decrease of 67 per cent occurred.

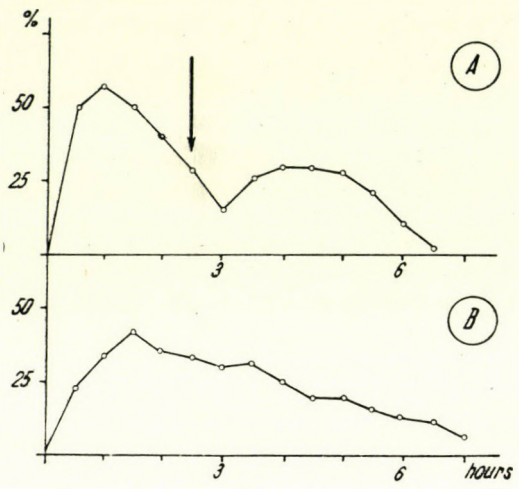


Fig. 3.

Increase (in per cents) in metabolic rate, induced by three injections of 0,05 mg/100 g of adrenaline each (average of 10 animals).
A=controls, B=decorticated animals.
The arrow indicates injection of the second and third dose of adrenaline, respectively

Plus-calories liberated by the three consecutive doses of adrenaline, calculated per 100 square cm body surface, were as follows. Control group: 1117 calories ; decorticated group : 2199 calories.

Discussion

In the introduction we have endeavoured to prove on the basis of literary data that the abolition of the metabolic effect of adrenaline cannot be ascribed solely to the disintegration, inactivation, or excretion of adrenaline, i. e. — in the wider sense of the word — to the elimination of the molecule. According to our experiments, the duration of adrenaline action is markedly prolonged following chemical blockade or surgical removal of the cerebral cortex. It has, therefore, to be assumed that in the normal animal the increase in the metabolic rate is made to cease by some counter-regulatory process started and directed by the cortex. Following chemical or surgical decortication it is the elimination of counter-regulation by which the effect is increased and prolonged. By means of the experiments hitherto performed it has not been possible to determine in

which area of the cortex and through what mechanism the counter-effect is produced. It also remains an open question whether the counter-regulatory activity operates exclusively against adrenaline, as a physiological substance, or is it of a general nature. To this problem data have already been supplied by Soviet authors who investigated correlations between the central nervous system and elimination of drugs. Thus *Byeloborodova* (23) succeeded in reducing the toxicity of aniline with phenamine (actedron); Cobkallo (24) inhibited cortical convulsants by electrically stimulating the hypothalamus : *Arbuzov* (25) prolonged by means of sympatectomy the duration of anaesthesia induced by chloralhydrate or medinal.

For the experiments we have intentionally selected an action of adrenaline peripheral in nature. The fact that the effect, a direct increase of cellular oxidation, is being counteracted by the cerebral cortex, seems to suggest that the restraining action is not directed against adrenaline as a physiological molecule. The response of the cortex might be due to the marked change at the periphery brought about by adrenaline. On this basis we feel justified to raise, and to subject to further investigations, the question whether the principle of the so-called elimination ought not be subject to revision, especially in the case of drugs which presumably act in the periphery. It might be assumed that any pharmacological agent causative of changes of a certain order of magnitude would at the same time start a central counter-regulatory activity finally resulting in the abolition of its own effect.

Summary

1. Two, resp. three consecutive doses of adrenaline brought about in the metabolic rate rises gradually declining in both height and duration.

2. In animals anaesthetised with 10 mg/100 g of sevenal, the effect of the second dose of adrenaline was inferior to the one elicited by the first. However, any of the effects lasted longer and were more marked than the response to similar doses in control animals.

3. In animals anaesthetized with a simultaneous dose of 3 mg/100 g of morphine and 0,1 mg/100 g of scopolamine, the metabolic action of adrenaline, was found to be more prolonged than in unanaesthetized animals. In the latter, the second dose exerted a more marked effect than the first.

4. A metabolic curve similar to the one obtained in animals treated with morphine and scopolamine was observed in decorticated animals following administration of adrenaline.

5. It may be assumed that in normal animals the abolition of the metabolic effect of adrenaline is not exclusively due to the eliminating factors hitherto known but a counter-regulatory mechanism of the central nervous system should also be taken into consideration. Sevenal, morphine, scopolamine and

surgical decortication render the mechanism inoperative and it is for that reason that the duration of the rise in metabolic rate induced by adrenaline becomes prolonged.

LITERATURE

1. *La Franca, S.:* Z. f. Exp. Path. Ther. **6,** 1 (1909).
2. *Abelin, J.:* Bioch Z. **129,** 1 (1922).
3. *Cori, C. F., Cori, G. T.:* J. Biol. Chem. **79,** 309 (1928).
4. *Fuchs, J., Roth, N.:* Z. f. Exp. Path. Ther. **10,** 187 (1912).
5. *Bernstein, S.:* Z. f. Exp. Path. Ther. **15,** 86 (1914).
6. *Issekutz, B.* sen.: Arch. Exp. Path. Pharm. **199,** 292 (1941).
7. *Adler, L.:* Arch. Exp. Path. Pharm. **86,** 159 (1920).
8. *Freund, H., Grafe, E.:* Arch. Exp. Path. Pharm. **93,** 285 (1922).
9. *Issekutz, B.* sen., *Issekutz, B.* jun.: Klinische Wochenschr. **29,** 1060 (1934).
10. *Yamakita, M.:* Tohoku J. of Exp. Med. **3,** 414 (1922).
11. *Boothby, V. M., Sandiford, J.:* Am. J. of Physiol. **59,** 463 (1922).
12. *Barkroft, J., Piper, H.:* J. of Physiology **44,** 359 (1912).
13. *Rhode, E., Ogawa, S.:* Arch. Exp. Path. Pharm. **39,** 200 (1912).
14. *Issekutz, B. jun.:* Arch. Exp. Path. Pharm. **177,** 463 (1935).
15. *Trendelenburg, P.:* Handb. Exp. Pharm. II/b, 1256.
16. *Auer, J., Meltzer, S. J.:* J. Pharm. Exp. Thder. **9,** 358 (1917).
17. *Blaschko:* Biochim. Biophys. Acta **4,** 130 (1950).
18. *Richter—Tingey:* J. Physiol. **97,** 265 (1939).
19. *Pataky, I., Pfeifer, A. K., Borsi, J.:* Acta Physiol. Hung. **2,** 199 (1951).
20. *Amsler, C.:* Arch. Exp. Path. Pharm. **90,** 257 (1921).
21. *Bayandurov, B. E.:* Трофическая функция голового мозга. Москва (1949)
22. *Issekutz, B. jun., Komlós, E.:* Arch. Exp. Path. Pharm. **205,** 406 (1948).
23. *Bjeloborodova:* Сов. Мед. Реф. Ов. 3. 147 (1949).
24. *Cobkallo, G. I.:* Проблемы Советской Физиол. Биох. Фармакол. *2.* 934 (1951).
25. *Arbuzov:* Фииол. Ж. *36,* 704 (1950).

ЦЕНТРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПОВЫШЕНИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ, ВЫЗВАННОГО АДРЕНАЛИНОМ

А. К. Пфейфер, И. Патаки и М. Форбат

Фармокологический институт медицинского университета, Будапешта

Резюме

Адреналин в дозах 0,05—0 1 мг/100 г вызывает у нормальных крыс повышение обмена веществ, продолжающийся 3—4,5 часа. Если же этим животным предварительно дают 10 мг/100 г севенала, или 3 мг/100 г морфина и 0,1 мг/100 г скополамина, то действие одинаковой дозы адреналина сохраняется в течение 6—7 часов. Морфином и хлоралгидратом можно продлить действие адреналина на обмен веществ также и у животных, получивших сперва адреналин, и у которых повышенный расход кислорода находится в стадии прекращения. На действие адреналина график животных, подвергнутых декортикации, также показывает удлиненные кривые обмена веществ.

На основе приведенных данных, авторы предполагают, что прекращение действия адреналина на обмен веществ нельзя объяснить известными до сих пор элиминирующими факторами. Среди причин этого прекращения действий следует предполагать также кортикальную контррегуляцию.

CONTRIBUTIONS TO THE PHYSIOLOGICAL ACTION OF ADRENALINE

By

G. HETÉNYI, jr., I. LICHTENECKERT, M. BEDŐ and G. PALKÓ

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY OF THE MEDICAL UNIVERSITY, SZEGED

(Received: May, 22 1952.)

The first account on the stimulating action of adrenaline on the central nervous system had been given by *Arbusov* (1) and *Kuznietzov* (2) at the 7th Physiological Congress of the Soviet Union. According to their experiments, adrenaline similarly to phenamine (amphetamine) decreases the depth of narcosis in dogs anaesthetized with barbiturates. This effect of adrenaline is naturally much weaker than that of phenamine. The action becomes, however, quite different when adrenaline is being administered by continuous infusion instead of a single injection. In that case its awakening effect comes near to that of phenamine.

In experiments on narcotized dogs carried out for quite a different purpose (3) it was frequently observed that, as a result of intravenous or intra-arterial infusion of relatively small amounts of adrenaline, the dog was apparently awakened. As the phenomenon occurred relatively often it seemed interesting to analyze its mechanism.

Methods

To clear the problem, three different routes were chosen. 1. In the experiments performed on dogs a method developed in our institute and allowing the quick and exact estimation of the blood flow in the profound femoral vein, was used (3). With simultaneous colorimetrical measurement of the arterio-venous oxygen difference (5) the oxygen consumption of the experimental area becomes calculable. Rectal temperature and arterial blood pressure were also followed in the experiments.

2. The motor activity of rats placed in cages fitted with a drum was recorded on a kymograph. The experiments were always carried out in duplicate. A rat injected with adrenaline was placed in one cage while a second rat serving for control and injected with an equal volume of physiological saline was placed in the other cage. The blood pressure of the rats was measured indirectly by means of a photometer.*

* The authors wish to express their thanks to Drs. *F. Herr* and *J. Pórszász* for performing the registrations.

3. The CO_2 content of the alveolar air was determined in superficially anaesthetized dogs. Nineteen such experiments were performed on fifteen dogs. In order to achieve the necessary superficial narcosis, three alternative ways were tried. One group consisting of 9 animals was narcotized with 0,9 to 1,0 g/kg urethane plus 1 to 2 mg/kg morphine 3 to 5 hours before beginning the registration. A second group, 6 animals, received on the evening of the preceding day 0,10 to 0,12 g/kg phenobarbital subcutaneously and, in addition, 0,15 to 0,30 g/kg urethane 1 to 2 hours before the experiment. The third group, 4 dogs, had been injected on the preceding evening with 0,03 to 0,04 g/kg of phenobarbital plus 0,5 to 0,8 g/kg of urethane, and before the beginning of the experiment as much urethane was given as required. (0 to 0,15 g/kg.)

Alveolar CO_2 was recorded continuously with a Noyons diapherometer. In the first series 9 dogs, alveolar air obtained through a tracheal cannula was led through a Krogh-ventile according to the Haldane—Priestley principle into an approximately 1 m long rubber tube of 2 cm internal diameter. From the proximal part of the tube alveolar air was led to a mixing drum, and from there directly into the »Messblock«of the diapherometer. Arterial pressure was measured directly by inserting a cannula into the carotid artery.

In the animals of the second and third groups all operative interference was avoided. Expired air was collected by an exactly fitting plaster mask mounted on the head of the animal. From this the air was conducted through the Krogh-ventile into the rubber tube. On account of the very superficial anaesthesia in these animals arterial pressure was not registered. In all the nineteen experiments the infusions were administered into the saphenous vein.

Results

(a) *Shivering produced in anaesthetized dogs*

The experiments in which the dogs were awakened by infusion of adrenaline are summarized in Table I. In two instances, the awakening action of adrenaline could repeatedly be demonstrated on the same animal. Three items of the data summarized in Table I. deserve special attention. 1. The minute quantity of adrenaline infused. The amount was in, or even below, the order accepted recently by *Guyton* and *Gillespie* (6) as the physiological rate of sympathine secretion. 2. The relatively low rectal temperature. 3. The fact that arterial pressure was not affected by the doses applied.

The course of one experiment is shown in Fig. 1. The intravenous infusion of adrenaline at a rate of 0,06 μg/kg/min. lasted almost one hour. In the first 25 minutes, no appreciable changes were observed. In the second half hour, blood flow gradually began to rise and at the end of the infusion it increased

TABLE I

Effect of adrenaline on muscular blood flow and oxygen consumption in anaesthetized dogs

No. of exper.	Dose of adrenaline μg/kg/min.	Blood flow ml/min.		Diff. %	O_2 consumption ml/min.		Diff. %	Changes in BP. Hg mm	Rectal temp °C	Note
		before	after		before	after				
1	0,06	24,5	80	+265	1,72	7,35	+327		36,8—37,2	Shivers
2a	0,93	10,5	17	+ 62	1,30	1,56	+ 20		38,2—38,1	Awaked
2b	0,41	9,5	10,5	0	0,44	1,10	+148		38,5—38,1	Shivers
3	0,74	20,5	37	+ 80	1,30	2,54	+ 95	160—170	37,5—37,7	Moves
4a	0,06	7,5	26	+247	0,70	2,72	+289	205—190	37,6—37,2	Shivers
4b	0,30	22,5	51	+ 87	7,05	2,30	+119	170—190	37,3—37,2	Shivers
5	0,12	13,2	60	+353	1,45	3,35	+131	130—150	38,2	Awaked

from the original 7,5 mg/min. to 17 ml/min. The maximal value of 26 ml/min. was, however, reached only one hour after the infusion had been terminated, the increase then amounting to + 247 per cent. The oxygen consumption of the experimental area was raised even more than the blood flow. It must be noted, however, that at the peak of the effect the dog began to shiver. Two and a quarter hours after the infusion had been brought to an end the effect was beyond its maximum, and both blood flow and oxygen consumption reached a steady state which, however, somewhat surpassed the respective starting values.

It seems, therefore, that under certain circumstances adrenaline is capable of lessening the depth of narcosis in anaesthetized dogs.

(b) *Effect on motor activity of rats*

Rats were superficially anaesthetized with 0,3 μg/kg of urethane, and their motor activity registered in the manner described above. Findings in one experiment are shown in Fig. 2., in which the upper two lines represent the motor activity of one rat, the lower two lines that of the other. The bottom line shows the time. At the arrow the first rat was injected subcutaneously with 200 μg/kg of adrenaline, the control with physiological saline. The few minutes immediately following injection must not be taken into account as the restless-

ness during that period was obviously due to pain caused by the injection. At later periods the difference in motor activity of the two rats becomes evident. The objection seems, however, justified that the applied dose, which was higher than the one administered to dogs, may have affected the circulation and the resulting rise in blood pressure may have excited the central nervous system which secondarily elicited the effect observed. To avoid such objections, rats of

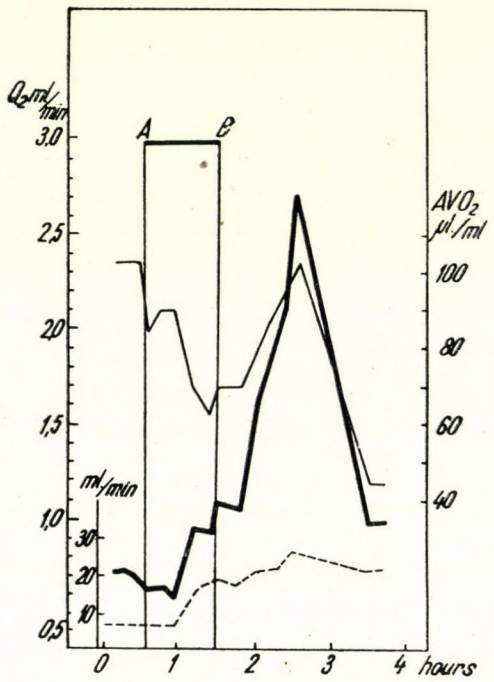


Fig. 1. Effect of intravenous infusion of adrenaline on the blood flow, arteriovenous O_2 difference and O_2 consumption of the muscles of the leg in anaesthetized dog. Ordinates, left. oxygen consumption O_2 ml/min, blood flow ml/min ; right: A—V O_2 difference µl/min. Abscisse, time in hours. Heavy line: O_2 consumption ; thin line: A—V O_2 difference ; broken line: blood flow. Between A and B intravenous adrenaline infusion of 0,06 γ/min/kg.

similar body weight were superficially narcotized with 0,3 g/kg of urethane, and their blood pressure was measured indirectly. Then 200 µg/kg of adrenaline were injected subcutaneously and the blood pressure was registered every three minutes. As it can be seen in Table II, under the conditions investigated 200 µg/kg of adrenaline brought about no significant change in the blood pressure of rats.

From this series of experiments it had to be inferred that, in doses not eliciting a pressor effect, adrenaline is capable of increasing the motor activity of superficially narcotized rats.

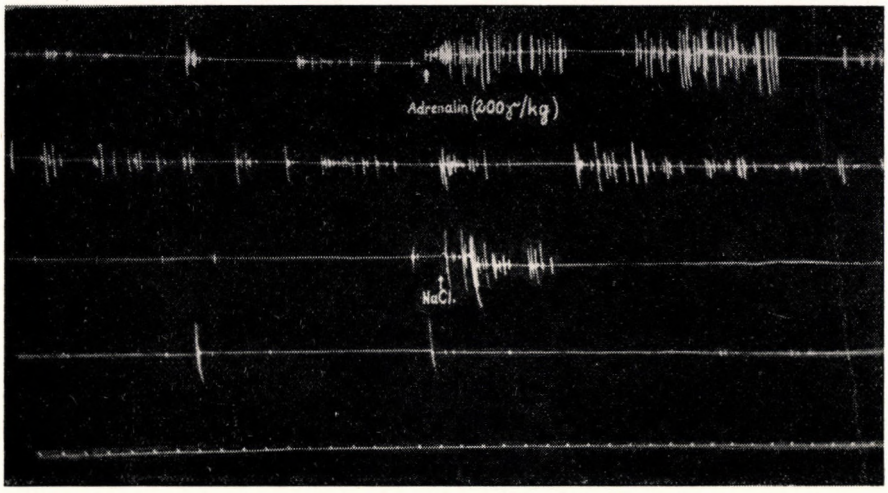


Fig. 2. Effect of adrenaline (200 μg/kg) on the motor activity of rats. Upper two lines : movements of the adrenaline injected rat. Lower two lines : movements of the NaCl injected control rat. Bottom line: time in minutes.

TABLE II.

Effect of 200 μg/kg *of adrenaline subcutaneously on the blood pressure of rats anaesthetized with* 0,3 *g/kg of urethane. Each figure represents the mean obtained from ten rats*

Number of rats	Body weight g	Initial BPmm Hg	Blood pressure following adrenaline within 3—6	6—9	9—12	12—16 min.-s
10	282±27,5	122±6	124±14	117±9	120±13	115±19

(c) *Effect on alveolar concentration of CO_2 in superficially anaesthetized dogs*

The problem remained, however, whether the apparent awakening action of adrenaline is ascribable to stimulation of the cerebral cortex, or to excitation of lower centers. In other words, may the phenomenon described be considered a real awakening, or was it simply due to excitement of the subcortical motor centres? In order to elucidate the problem, the effect of minute doses of adrenaline on the CO_2 content of the alveolar air was studied. The fact that during sleep the CO_2 content of the alveolar air increases, whereas it drops at awakening, enables us to consider it as an index of the depth of narcosis. With the method described above, 52 adrenaline and 25 saline infusions were carried out in nineteen experiments. The dose of adrenaline administered varied from 0,008 to 0,32 μg/kg/min ; in most cases (37 infusions), it was above 0,1 μg/kg/min. A decrease of at least 20 per cent in the alveolar CO_2 content, ensuing during or immediately after the infusion was considered characteristic of „awakening". Out of the 52 adrenaline infusions, 13 resulted in awakening the dog. However, as in

6 of the 24 control observations the animal was also awakened, the above result can by no means be considered significant.

As in both adrenaline-infused and saline-infused groups the ratio of positive and negative results was exactly 1 to 4, no statistical analysis is needed for deducing that adrenaline did not decrease the depth of narcosis in superficially anaesthetized dogs. Consequently neither the effect increasing the motor activity of rats nor the one apparently awakening dogs can be regarded as a real awakening action. It seems to be rather a stimulating effect exerted upon subcortical motor centres.

Discussion

The stimulating effect of small doses of adrenaline on the central nervous system has first been demonstrated by *Lissák*, *Piribauer* and *Martin* (7) who had found that on cats the intensity of the patellar reflex increased after both splanchnic stimulation and 40 to 50 μg of adrenaline. As the effect could not be elicited by other pressor substances, nor by direct stimulation of the gastroenemius, the authors concluded that the site of action of adrenaline was at the spinal centre of the patellar reflex. The doses administered by *Lissák* and his associates were higher than those used in the present experiments and were found to raise blood pressure. *Kirillova* (8), on the other hand, observed that the excitability of the isolated spinal cord of frogs could be increased by adrenaline in a concentration of $2 \cdot 10^{-7}$. Thus it seems that physiologically low concentrations of adrenaline are capable of increasing the reflex excitability of the spinal cord. However, experiments carried out with higher concentrations seem contradictory. Whereas *Lissák* and his associates could increase the reflex excitability with 400 μg of adrenaline, *Schweitzer* and *Wright* (9) recorded inhibition after high doses, and *Kirillova*, working on the isolated spinal cord of frogs, arrived also at a similar conclusion, although, according to this author, in the presence of glucose an increase of reflex excitability could be obtained from as high doses of adrenaline as would otherwise lead to irreversible inhibition.

From among the responses to adrenaline of the higher centres especially that of the respiratory centre was studied. According to *Stacy* and *Denunbrun* (10), the respiratory volume of hypoxaemic dogs is rapidly decreased following acute adrenalectomy, but can be restored to almost normal by infusion of 0,25 μg/kg/min of adrenaline. In sharp contrast to the exciting effect of physiological doses, large doses (7 to 15 mg/kg intraperitonally) seem capable of stopping respiratory activity (11). Taking also into account that in the vagotomized medullary animal intravenous administration of adrenaline arrests respiration even after the carotid artery has been ligated, a direct inhibitory action on the respiratory centre seems to be proved.

According to the above data, small, i. e. physiological, doses of adrenaline increase, while large doses decrease the activity of the respiratory centre. The

phenomenon resembles that observed on the spinal cord, yet with the difference that if the respiratory centre, representing a higher level of organisation, is involved, the biphasic action of adrenaline becomes more evident.

Adrenaline exerts its effect also on the highest levels of the central nervous system. In this connection, the results of *Arbusov* (1) and *Kuznietzov* (2) mentioned in the introduction must be cited again. Their observations allow to infer that an action is exerted on the cerebral cortex. In good accordance with this are the experiments of *Lehmann* and *Michaelis* (13) who could demonstrate a sufficiently strict correlation between the adrenaline concentration in the blood and the working ability of the experimental person. As a direct effect on muscle could be excluded, it had to be inferred that an excitatory effect was being exerted on the higher organisatory levels of the nervous system. The situation becomes, however, profoundly changed when the adrenaline is being administered directly into the cerebral ventricles instead of into the blood. *Leimdorfer* (14) was able to produce surgical anaesthesia by means of exceedingly high doses of adrenaline injected directly into the cerebral ventricles.

As to our own findings, at first the extreme smallness of the applied doses must be discussed. Neither the dose which caused shivering in the dog, nor the one which increased motor activity in rats was found to be in the magnitude of pressor doses. There is adequate ground to assume that the phenomenon observed was the physiological action of adrenaline directed on the central nervous system.

It is more difficult to answer the question concerning the site of action of adrenaline in the nervous system. The coordinated movements of the rats, as well as the shivering of the narcotised dog make it improbable that the centre is localized in the spinal cord. On the other hand, the fact that the CO_2 content of the alveolar air was not considerably lowered by adrenaline infusion, speaks against a cortically induced mechanism. Thus it is most probable that the effect of adrenaline is directed on the subcortical extrapyramidal motor centres. Other considerations also favour this supposition.

As seen from Table I, the motor action of adrenaline was observed mostly in dogs with a relatively low rectal temperature. Motion usually appeared in the form of shivering. The neural pathways regulating the temperature by giving rise to shivering originate from the subcortex and reach the motor cell of the ventral horn by the rubrospinal and testospinal tracts (15). In our experiments, two subliminal stimuli were probably summed. One consisted in the slight drop of rectal temperature, which in itself did not suffice to induce the extrapyramidal reflex of shivering, the other having been the adrenaline affecting the same centres. As a result of their combined effect, the dog, which had not shivered at a given rectal temperature, began to do so as a result of adrenaline infusion. This of course does not mean that adrenaline in itself has no motor effect.

There undoubtedly exist some arguments against the localization into the

extrapyramidal system of the motor effect of adrenaline, in the first place *Arbusov's* experiments (1). It must also be taken into account that in the present experiments the only factor inconsistent with cortical localization was the lack of decrease of the CO_2 content of alveolar air following adrenaline infusion. However, the negative result might be ascribed to the inhibitory effect of adrenaline on the activity of the respiratory centre, neutralizing the decrease brought about by awakening. Though only large doses of adrenaline seem to inhibit the activity of the respiratory centre (11, 12), and smaller doses rather stimulate it (10), the above consideration might still be taken into account.

Summarizing the result, it seems most probable that the site of action of the motor effect of physiological amounts of adrenaline lies in the extrapyramidal nervous system.

The authors wish to express their thanks to Professor B. Issekutz Jr. for helpful suggestions and criticism.

Summary

Minute doses of adrenaline seem to decrease the depth of narcosis in anaesthetized dogs and increase motor activity of slightly anaesthetized rats. However, they do not alter the CO_2 content of the alveolar air in slightly anaesthetized dogs.

It seems probable that the site of action of physiological doses of adrenaline is the extrapyramidal system.

LITERATURE

1. *Arbusov:* Communication at the VII. Physiological Congress of the USSR. 1949.
2. *Kuznietzov:* Communication at the VII. Physiological Congress of the USSR. 1949.
3. *Issekutz, B. jr., Lichtneckert, I., Hetényi, G. Jr.:* Arch. int. Pharmacodyn. **84**, 317 (1950).
4. *Issekutz, B. Jr., Hetényi, G. Jr., Nagy, H,. Lung, M.:* Acta Physiol. Hung. **2**, 98, (1949)
5. *Issekutz, B. Jr., Hetényi, G. Jr., Feuer, I.:* J. Physiol. **108**, 9, (1949).
6. *Guyton, A. G., Gillespie, W. M.:* Am. j. Physiol. **165**, 320, (1951).
7. *Lissák, K., Piribauer, K., Martin, J.:* Debreceni T. I. Társ. Munkái **7**. 2, (1941).
8. *Kirillova, A. A.:* cit. Kísérl. Orvostudomány **2**, 386, (1950).
9. *Schweitzer, A., Wright, S.:* J. Physiol. **88**, 476, (1937).
10. *Stacy, R. W., Denunbrun, D. O.:* Am. J. Physiol. **161**, 51 (1950).
11. *Nickerson, M., Berghout, J., Hammarstrom, R. N.:* Am. J. Physiol. **160**, 469 (1950).
12. *Hoff, H. E., Breckenridge, C. G., Cunningham, J. E.:* Am. J. Physiol. **160**, 485, (1950).
13. *Lehmann, G., Michaelis, A.:* Arbeitsphysiologie **12**, 305, (1943).
14. *Leimdorfer, A.:* J. Pharmacol. Eóp. Therap. **98**, 62, (1950).
15. *Uprus, V., Gaylor, J. B., Carmichael, E. A.:* Brain. **58**, 220, (1932).

О ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ АДРЕНАЛИНА

Г. Хетенъи мл. И. Лихтенекерт, М. Беде и Г. Палко
Физиологический институт медицинскго университета, Сегед

Резюме

Маленькие дозы адреналина уменьшают, повидимому, при известных условиях глубину наркоза анестезированных собак, и повышают моторную активность слабо анестезированных крыс. Однако, эти дозы не изменяют содержание CO_2 альвеолярного воздуха слабо анестезированных собак.

Следует считать вероятным, что действие физических доз адреналина исходит из экстрапирамидной системы.

EFFECT OF MONOFLUOROACETIC ACID ON THE INTESTINAL ABSORPTION OF GLUCOSE AND GLYCINE

By

M. WINTER

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY OF THE MEDICAL UNIVERSITY, SZEGED

(Received : September 15, 1952)

The fact that amino acids are absorbed from the intestine by a specific cellular mechanism, can generally be accepted (1). The nature of this mechanism remains, however, obscure and even less is known about it than about the transfer which participates in the absorption of carbohydrates. According to *Cori* (2), glucose and glycine compete with one another in the absorption, and he concluded that these substances were absorbed by the same transfer mechanism. However, experiments performed with phloridzin unequivocally demonstrate that only the absorption of glucose is inhibited by the substance, while the absorption of glycine and other amino acids remains unchanged (3, 4, 5, 6). Monoiodoacetic acid has often been used to inhibit the selective absorption of glucose and the absorption rate of amino acids is similarly decreased by that enzyme-poison. Nevertheless the poisonous effect of monoiodoacetic acid is high enough to make it probable that serious injury of the intestinal mucous membrane results from its use (6).

The decrease in glucose absorption following phloridzin administration is due presumably to the inhibition of phosphorylation. It seemed therefore of interest to study the effect of monofluorohacetic acid (MFA) on intestinal absorption. MFA does not inhibit glycolysis, synthesis of ATP or enzymatic functions (7) : its deleterious effect consists only in the blocking of *Krebs*' tricarboxylic acid cycle. Thus phosphorylation can proceed undisturbed during MFA poisoning.

Methods

The experiments were performed in urethane narcosis on albino rats weighing 180 to 200 g. The perfusion method of *Horváth* and *Wix* (8) was used. The method, details of which are to be found in a previous paper (1), offers the advantage over other procedures used for studying intestinal absorption that it makes it possible to determine the absorption rate on the same animal before and after poisoning. After two control perfusion periods the animals were given 1 to 2 mg of MFA intraperitoneally and an hour later the rate of absorption was

examined again. Glucose was determined according to *Somogyi* (9), nitrogen-containing substances with *Kjeldahl*'s method. Statistical estimations were made with *Fisher*'s »t« test (10).

Results

First the absorption of urea was studied in 3 animals. According to earlier experiments, urea is absorbed solely by diffusion (1). The absorption of urea after MFA treatment showed a minimal decrease in two animals (4 per cent of both), while in the third rat the absorpttion rate remained constant. This shows that absorption by diffusion is not inhibited by monofluoroacetic acid.

Glucose absorption before and after MFA treatment was studied in 8 rats. The results are shown in Table I. An average decrease of 3,5 per cent was observed in the absorption rate, but after statistical analysis this decrease did not prove significant ($P > 0{,}05$). It can, therefore, be concluded that MFA does not inhibit the mechanism participating in the specific absorption of glucose.

The absorption of glycine was studied in 12 experiments. The results are shown in Table II. The absorption rate decreased in 10 animals, while it did not change in 2. The decrease was substantially greater than that observed in the glucose experiments, the average decrease being 13,3 per cent. By statistical analysis this difference proves highly significant ($P < 0{,}01$), and the difference between the changes in glucose and glycine absorption is also significant ($P < 0{,}02$). (Table III.)

Finally 5 animals were used for studying the absorption of glycine-amide, which had been shown earlier to be absorbed solely by diffusion (1). According to the expectation, the absorption of glycine-amide suffered no decrease after MFA poisoning. The small increase observed (average 4 per cent) is not significant ($0{,}10 > P > 0{,}05$). The results are shown in Table IV.

TABLE I

Absorption of glucose

Load in mM	Before MFA in %	After MFA in %	Difference
0,16	77	73	— 4
0,18	62	63	+ 1
0,52	65	62	— 3
1,24	70	60	—10
1,50	49	40	— 9
1,50	67	69	+ 2
1,60	40	39	— 1
1,70	42	38	— 4
		Mean	— 3,5%

$t = 2{,}2974$

$P > 0{,}05$

TABLE II

Absorption of glycine

Load in mM	Before MFA in %	After MFA in %	Difference
0,50	54	57	+ 3
0,60	57	38	—19
0,63	57	49	— 8
0,85	46	33	—13
0,86	64	67	+ 3
0,93	53	39	—14
0,98	59	32	—27
1,00	46	39	— 7
1,13	53	32	—21
1,26	53	41	—12
1,45	43	22	—21
1,64	44	21	—23
		Mean	—13,3%

$t = 4{,}7366$
$P < 0{,}01$

TABLE III

Comparison of glucose and glycine absorption after MFA

Decrease in glucose absorption in %	Decrease in glycine absorption in %
—3,5	—13,3

Difference 9,8%
$t = 2{,}6575$
$P < 0{,}02$

TABLE IV

Absorption of glycine-amide

Load in mM	Before MFA in %	After MFA in %	Difference
0,48	28	43	+15
0,50	38	31	— 7
0,53	38	31	— 7
0,58	40	40	0
0,86	23	42	+19
		Mean	+ 4%

$t = 2{,}2942$
$0{,}10 > P > 0{,}05$

Discussion

On the basis of the experiments it may be assumed that glucose and glycine, the most often studied sugar resp. amino acid, are absorbed from the small intestine by different mechanisms. In the absorption of glycine oxidative reactions take a direct part, which is not the case with glucose. Similar conclusions were reached by *Northup* and *Van Liere* (11), who studied the intestinal absorption of glucose and glycine under a pressure of oxygen of 53 mm mercury in dogs and who found that the absorption rate of the former substance did not differ from the normal while that of the latter suffered a significant decrease. MFA in the doses administered (5—10 mg per kg body weight) blocks the tricarboxylic acid cycle, i. e. the oxidative reactions. This is proved by the accumulation of citrate in the poisoned tissues one hour after the poisoning (12).

In those experiments, in which a small decrease was observed in glucose absorption, MFA probably impaired the circulation of the animal. The 2 negative results with glycine cannot satisfactorily be interpreted. In these cases the intestinal mucous membrane may have possessed sufficient energy reserves while in a later phase of the poisoning the absorption may have diminished.

The author is indebted to Prof. *B. Issekutz jr.* for valuable help and criticism, and to *Dr. G. Hetényi jr.* for the statistical analyses.

Summary

5—10 mg of monofluoroacetic acid per kg of body weight administered intraperitoneally did not alter the intestinal absorption of glucose in rats, while the absorption of glycine was significantly diminished. This makes it probable that sugars and amino acids are not absorbed by the same cellular mechanism. In the absorption of amino acids oxidative reactions play a more direct part than in the absorption of sugars. The latter function may continue even after the oxidative pathway has been blocked.

LITERATURE

1. *Hetényi, G. Jr.* and *Winter, M.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 49, (1952).
2. *Cori, C. F.:* Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. **24**, 125 (1926).
3. *Wilson, R. M.:* J. Biol. Chem. **97**, 497, (1932).
4. *Wertheimer, E.:* Arch. f. d. ges. Physiol. **233**, 514, (1933).
5. *Lundsgaard, E.:* Biochem. Zeitschr. **264**, 221, (1933).
6 *Öhnell, R.* and *Höber, R.:* J. Cell. & Comp. Physiol. **13**, 161, (1939).
7. *Issekutz, B. Jr., Lichteneckkert, I., Hetényi, G. Jr., Gáspár—Németh, Zs.* and *Diósy A.:* Acta Physiol. Hung. **2**, 391, (1951).
8. *Horváth, I.* and *Wix, G.:* Acta Physiol. Hung. **2**, 435, (1951).
9. *Somogyi, M.:* J. Biol. Chem. **160**, 61, (1945).
10. *Fisher, R. B.:* Statistical Methods for Research Workers. Oliver & Boyd, Edinburgh. 1934.
11. *Northup, D. W.* and *Van Liere, E. J.:* Am. J. Physiol. **134**, 288, (1941).
12. *Buffa, P.* and *Peters, R. A.:* J. Physiol. **110**, 488, (1950).

ВЛИЯНИЕ МОНОФТОРУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА КИШЕЧНУЮ АБСОРБЦИЮ ГЛЮКОЗЫ И ГЛИЦИНА

М. Винтер

Физиологический институт медицинского университета, г. Сегед

Р е з ю м е

5—10 мг/кг монофторуксусной кислоты, данные внутрибрюшно, не изменяли кишечную абсорбцию глюкозы у крыс, в то время как абсорбция глицина значительно уменьшалась. Сахары и аминокислоты, повидимому, не абсорбируются тем же самым целлюлярным механизмом. Окислительные реакции играют в абсорбции аминокислот более непосредственную роль, чем при абсорбции сахаров. Абсорбция последних може продолжаться даже после блокады окислительных путей.

ZUR FRAGE DER OSMOREGULATION DES LIQUORDRUCKES

Von

I. FÉNYES und A. HEDRI

II. CHIRURGISCHE KLINIK DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen: am 25. August 1952)

Die intrakraniellen Blutungen stellen eine der unberechenbarsten Komplikationen der akuten Gehirntraumen dar. Ein Teil dieser Blutungen benötigt sofortigen, bzw. dringlichen chirurgischen Eingriff (epidurales, subdurales Hämatom, usw.), ein anderer Teil erfordert jedoch keine chirurgische Behandlung, obzwar die schädliche Wirkung der Blutungen ohne Zweifel besteht. Dies sind vor allem die subarachnoidealen Blutungen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war den Pathomechanismus dieser schädlichen Wirkung zu erforschen.

Bagley's (1) Untersuchungen konnten bereits diese schädlichen Folgen nicht nur auf klinischem, sondern auch auf experimentellem Wege nachweisen. Die Versuchstiere, insbesondere junge Hunde, wurden nach Injizierung von 0,5—2,5 ccm Blut in die cysterna cerebello-medullaris unruhig, es traten bei ihnen Krämpfe auf und mehrere Tiere gingen innerhalb von Tagen infolge einer allgemeinen Kachexie zugrunde. Anatomisch konnten Erweiterungen der Gehirnventrikel und Verdickung der Meningen festgestellt werden, später auch strukturelle Veränderungen der Gehirnrinde. *Russel* (2) befasste sich klinisch mit der Frage des Zusammenhanges zwischen den durch Schädeltraumen hervorgerufenen subarachnoidealen Blutungen und der Liquordruckerhöhung, mit besonderer Rücksicht auf die bei solchen Kranken auftretenden Bewusstlosigkeitszuständen. Seiner Ansicht nach vermögen zwar Blutungen in dem Liquorraum (zerebrales Aneurysma) Bewusstlosigkeit zu verursachen, den Liquordruck erhöhen sie jedoch nicht unbedingt in bedeutendem Masse. *Russel* denkt vielmehr an die Wirkung der in den Liquorraum gelangten »chemischen Konstituenten« des Blutes. *Webster* und *Freeman* (3) untersuchten das Verhalten des Liquordruckes nach intravenöser Injektion von verschiedenen Lösungen bei normalen und gehirntraumatisierten Hunden und konnten feststellen, dass, mit Ausnahme eines einzigen Tieres, in sämtlichen ad exitum gekommenen Fällen die Zerebrospinalflüssigkeit eine hohe rote Blutkörperchenzahl aufwies. Mit anderen Worten, es bestand ein inniger Zusammenhang zwischen dem Tod der Versuchstiere und der Menge des im Liquor vorhandenen Blutes, denn in 9 von 10 an Gehirntrauma eingegangenen Tieren war die Zahl der roten Blutkörperchen im Liquor zwischen 1—5 000 000. Zugleich war aber der Liquordruck bei ihren Versuchstieren nicht wesentlich erhöht.

Andere Forscher fanden jedoch, dass der Liquordruck von der chemischen Beschaffenheit des Liquors, insbesondere von der Menge des in ihm enthaltenen Blutes, abhängig ist. So machte bereits *Howe* (4) darauf aufmerksam, dass eine in dem Subarachnoidealraum erfolgende Blutung oder dahin injiziertes Serum den Liquordruck infolge von »osmotischer Wirkung« erhöht. Es sind jedoch nicht nur Blut, Blutserum bzw. dessen Eiweisstoffe — also Stoffe, die physiologischerweise in ausserordentlich geringen Mengen im Liquor vorhanden sind — die eine Erhöhung des Liquordruckes in Begleitung einer sog. aseptischen Meningitis verursachen, sondern auch die intrazisternale Einführung von sterilen, isotonischen Lösungen normaler Liquorbestandteile. So zeigten *Webster* und *Freeman* (3), dass beim nicht anästhesierten und nicht traumatisierten Hunde bereits die Verbindung der Zisterne mit einem mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Manometer nach Ablauf einer gewissen Zeit eine 20—60 mm/H_2O entsprechende Liquordruckerhöhung in Begleitung einer Zellzahlerhöhung von 10 000 pro cmm hervorzurufen vermag. *Schnedorf* und Mitarbeiter (6) erwähnen, dass nach einem geringen Kopftrauma 6—8 ccm langsam abgesaugter und aseptisch zurückgespritzter Liquor eine 124—156 mm/H_2O entsprechende Liquordruckerhöhung mit Eiweissvermehrung (122 mg%) und Zellzahlerhöhung (1,546 pro cmm) zu verursachen vermag. Die Beweiskraft dieses Versuches wird jedoch durch das vorangegangene Kopftrauma vermindert.

Parker und *Lehman* (5) fanden, dass intrazisternal eingeführtes defibriniertes Blut, Blutserum und Hämoglobin eine beträchtliche Liquordruckerhöhung verursachen, während gewaschene rote Blutkörperchen diese Wirkung nicht ausüben. Daraus folgt nach ihrer Ansicht, dass in diesen Fällen wahrscheinlich der kolloid-osmotische Druck die Ursache der Liquordruckerhöhung darstellt, was auch durch den negativen Erfolg der Versuche mit gewaschenen roten Blutkörperchen bewiesen zu worden scheint.

Der Zweck unserer eigenen Untersuchungen war nun, die liquordruckerhöhende Wirkung der Serumproteine an Hand von intrazisternaler Einführung von homologen, isolierten, isotonischen, sterilen Eiweissfraktionen, d. h. von Hundeserumalbumin, bzw.-globulin zu erforschen.*

Methodik

Wir benützten ein einfaches U-förmig gebogenes Glasrohr von 2,5 mm Innendurchmesser, das dem zu erwartenden Liquordruck entsprechend vorher mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung auf 80—100 mm gefüllt wurde. Es wurden nun folgende Lösungen eingeführt: Hundeserumalbumin, bzw. —globulin, Dextran in 6%-iger Konzentration, isotonische, sterile Dextrose- und Carbamidlösungen, endlich physiologische Kochsalzlösung. Der pH der Eiweisslösungen war 7,4. Es wurde darauf geachtet, bei der Einspritzung der Lösung in die Zisterne einen Liquorverlust möglichst zu vermeiden. Immer wurde vorher genau die einzuspritzende Menge des Liquors abgesaugt, um einer artifiziellen Druckerhöhung vorzubeugen. Die Einspritzung erfolgte unter minimalem Druck, meistens genügte die Schwere des Stöpsels

* Die entsprechenden Lösungen wurden uns in freundlicher Weise vom Staatlichen Seruminstitut «Phylaxia» zur Verfügung gestellt, wofür wir Oberarzt Richard Backhaus, dem Leiter der Serumabteilung, an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.

der Spritze, so dass die Lösung ohne die geringste Kraftanwendung der Hand, sozusagen von sich selbst in die Zisterne hineinfloss. Nach Einführung der Lösung wurden die Liquordruckwerte in allen 15 Minuten abgelesen. Die Zeitdauer des Versuches betrug im allgemeinen 5—6 Stunden; während dieser Zeit erreichte der Liquordruck gewöhnlich das Maximum, wonach er allmählich herabzusinken begann. Der Liquor wurde meistens vor und nach dem Versuch untersucht. Die Versuche wurden in Evipannarkose ausgeführt. In mehreren Fällen wurde gleichzeitig auch Blutdruckmessung in der Femoralarterie vorgenommen. Auch die Atemfrequenz wurde öfters bestimmt. Auf die Asepsis wurde genau geachtet. Wir bearbeiteten insgesamt 52 Hunde, davon erhielten 40 die oben erwähnten Albumin- bzw. Globulinlösungen, den übrigen Versuchstieren wurden Dextran, Dextrose, Carbamid und physiol. Kochsalzlösung verabreicht. Einigen Hunden gaben wir auch Autoserum. Das Körpergewicht der Versuchstiere betrug im allgemeinen etwa 8—10 kg.

Was nun die Wirkung der erwähnten Lösungen auf den Liquordruck anbelangt, so konnten wir im allgemeinen feststellen, dass nach Ablauf einer gewissen Zeit eine beträchtliche Liquordruckerhöhung zustande kam, die, wie bereits erwähnt, in 5—6 Stunden ihr Maximum erreichte, um dann wieder langsam herabzusinken. Es bestand jedoch unerwarteterweise kein nennenswerter Unterschied zwischen den durch Albumin, bzw. Globulin verursachten Liquorerhöhungen. Mit Globulin bekamen wir sogar noch etwas höhere Liquordruckwerte, obwohl der kolloid-osmotische Druck des Albumins bekanntlich nicht unwesentlich höher ist, als derjenige des Globulins. Daraus folgerten wir nun, dass in dieser Beziehung nicht allein der kolloid-osmotische Druck der eingespritzten Lösung eine Rolle spielt.

Es wurde auch versucht, andere hochmolekulare, für den Organismus indifferente Stoffe in die Zisterne einzuführen, so z. B. das Dextran. Das Dextran erschien uns aus dem Grunde als geeignet, weil es auch beim Menschen ohne toxische Wirkung i. v. eingespritzt werden kann. Die verabreichte 6%-ige Konzentration des Dextrans entspricht dem kolloid-osmotischen Druck des Blutserums. Die Wirkung des Dextrans auf den Liquordruck entsprach im wesentlichen derjenigen der Serumproteine, d. h. es zeigte sich eine beträchtliche Erhöhung des Liquordruckes.

TABELLE I

Albumin bzw. Globulin

Nr.	Albumin-Globulin mg/kg	Albumin Liquordruck Maximalwerte mm/H_2O	Globulin Liquordruck Maximalwerte mm/H_2O
1	5	527	560
2	7	581	620
3	9	363	445

Tabelle I zeigt, dass nach intrazisternaler Verabreichung von pro kg Körpergewicht gleicher Mengen Albumins, bzw. Globulins die Maximalwerte der zustandegekommenen Liquordruckerhöhungen nahezu gleiche Werte auf-

weisen. Es ist auch ersichtlich, dass eine Erhöhung der verabreichten Eiweissmengen von 5 mg/kg auf 7 mg/kg auch die entsprechenden Maximalwerte der Liqourdruckerhöhungen steigert, während eine weitere Steigerung der Eiweissmengen von 7 mg/kg auf 9 mg/kg keine Erhöhung mehr im Liquordruck hervorruft. Im Gegenteil, es zeigten sich sowohl beim Albumin-, wie auch beim Globulinversuch niedrigere Maximalwerte als diejenigen der geringsten verabreichten Menge (5 mg/kg). Die Maximalwerte der Globulinversuche sind durchwegs etwas höher, als diejenigen der Albuminversuche.

TABELLE II

Albumin

Nr.	mg/kg	Liquordruck Maximalwerte mm/H_2O
1	44	227
2	6	260
3	9	382
4	8	486
5	7	581

In Tabelle II sind die Maximalwerte der Liquordruckerhöhung von 5 Albuminversuchen angeführt, und zwar in der Reihenfolge von steigenden Werten ruppiert. Es ist ersichtlich, dass die verabreichten Albuminwerte (mg/kg) keineswegs den Maximalwerten der Liquordruckerhöhungen proportional sind, der niedrigste Maximalwert (227 mm/H_2O) wurde sogar von einer in dieser Reihe unverhältnismässig hohen Eiweissmenge (44 mg/kg) verursacht.

TABELLE III

Globulin

Nr.	mg/kg	Liquordruck Maximalwerte mm/H_2O
1	10	280
2	10	382
3	9	445
4	5	560
5	10	660

Tabelle III zeigt für das Globulin im wesentlichen dasselbe. Auch hier sind die Maximalwerte der Liquordruckerhöhungen von 5 Globulinversuchen in steigender Reihenfolge gruppiert und die ihnen entsprechenden Globulinmengen

(mg/kg) daneben angeführt. Es ist ersichtlich, dass sowohl der niedrigste Maximalwert (280 mm/H_2O), wie auch der höchste Maximalwert (660 mm/H_2O) von der gleichen Globulinmenge (10 mg/kg) verursacht wurden.

Es geht also aus diesen Versuchen klar hervor, dass die intrazisternal verabreichte Eiweissmenge für die verursachte Liquordruckerhöhung nicht entscheidend ist.

TABELLE IV

Dextran

Nr.	mg/kg	Liquordruck Maximalwerte mm/H_2O
1	33	260
2	30	270
3	10	470

Aus Tabelle IV ist dasselbe für das Dextran ersichtlich. Die verabreichten Mengen von 30 und 33 mg/kg riefen nahezu gleiche Maximalwerte von Liquordruckerhöhung hervor (270, bzw. 260 mm/H_2O), während 10 mg/kg, also eine dreimal geringere Menge, nahezu das Doppelte der Maximalwerte der höheren Mengen verursacht (470 mm/H_2O).

Diese Versuche zeigten, dass hochmolekulare Stoffe (Albumin, Globulin, Dextran) den Liquordruck zu steigern vermögen. Der Mechanismus dieser Druckerhöhung wird jedoch dadurch nicht erklärt, da, wie gesagt, zwischen der verabreichten Menge und der verursachten Druckerhöhung keine Proportionalität bestand. Noch auffallender ist jedoch, dass Stoffe von verschiedenem kolloidosmotischen Druck, wie dies beim Albumin und Globulin der Fall ist, fast gleiche Liquordrucksteigerungen zu verursachen imstande sind, das Globulin sogar noch erheblichere.

Wir versuchten auch Stoffe von ganz kleinem Molekulargewicht (Dextrose, Carbamid, Kochsalz) in 2 ccm isotonischer, steriler Lösung intrazisternal zu verabreichen, und fanden, dass eine, obwohl bedeutend geringere, Liquordruckerhöhung ebenfalls zustande kommt.

Auf Abb. 1 wurden die Liquordruckerhöhungskurven von vier intrazisternal verabreichten Stoffen (Albumin, Globulin, Dextran, Dextrose), graphisch dargestellt. Die Kurven stellen keine Durchschnittswerte von mehreren, bzw. sämtlichen Versuchsergebnissen dar, sondern sie zeigen den Verlauf von 4 individuellen Versuchen, welche die maximalen Liquordruckerhöhungen, gewonnen mit den betreffenden Stoffen, erkennen liessen. Es wurde bei der kurvenmässigen Abbildung der Experimente bloss getrachtet, den zeitlichen Verlauf der Liquordruckerhöhungen zu demonstrieren. Auf der Abszisse sind

die Zeitwerte in Stunden, auf der Ordinate die Liquordruckwerte in mm/H_2O aufgetragen. Wir sehen, dass die Kurven des Albumins, bzw. des Globulins derjenigen des Dextrans sehr ähnlich sind, während die der Dextrose einen bedeutend niedrigeren Verlauf nimmt.

Nachdem die angeführten Versuche uns in der Klärung der Frage eines Zusammenhanges zwischen eingeführter Lösung und Liquordruckerhöhung nicht weiterzuführen vermochten, stellten wir Untersuchungen betreffs des Eiweissgehaltes des *am Ende des Versuches* abgesaugten Liquors an. Es zeigte

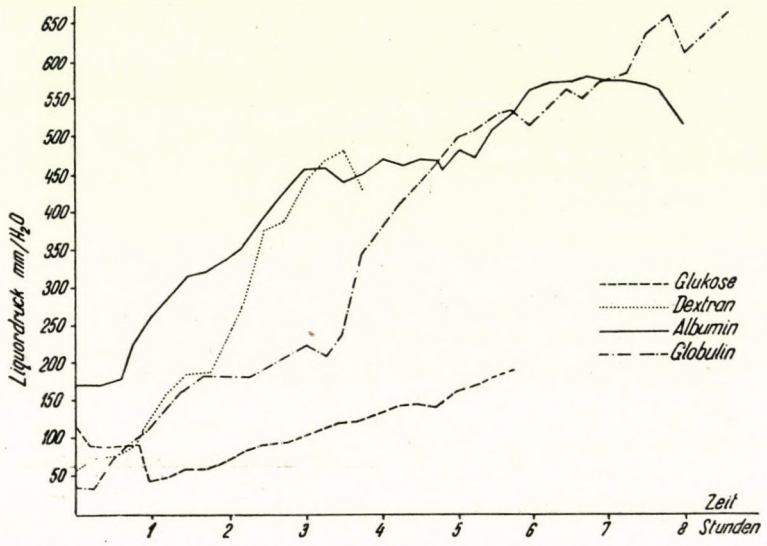


Abb. 1

sich zunächst, dass eine wesentliche Erhöhung des eingespritzten Eiweissgehaltes nach den während des Versuches verstrichenen Stunden anzutreffen war, und zwar auf etwa das vierfache der ursprünglichen Konzentration. So betrug z. B. die am Ende des Versuches gefundene Eiweisskonzentration nach Verabreichung von 10 mg/kg Albumin, bzw. Globulin bei einem Hunde von 10 kg Körpergewicht etwa 2 000 mg%. Wird die Gesamtliquormenge eines Hundes von 10 kg — an Hand der Analogie beim Menschen — auf etwa 20 ccm berechnet, so entspricht die eingespritzte Menge (100 mg) einer anfänglichen Eiweisskonzentration von 500 mg % und der am Ende gefundene Wert beträgt das vierfache des Anfangswertes.

Bemerkenswerte Zusammenhänge ergeben sich aber auf Grund eines Vergleiches der Liquoreiweissmengen am Ende des Versuches mit den Maximalwerten der Liquordruckerhöhungen. In Tabelle V sind die Maximalwerte der Liquordruckerhöhungen von 7 verschiedenen Versuchen in steigender Reihenfolge gruppiert, mit Angabe des eingeführten Stoffes, des Eiweissgehaltes und

TABELLE V

Nro.	Verabreichter Stoff	Am Ende des Versuches		
		Liquoreiweiss mg %	Liquorzellzahl pro mm³	Liquordruck mm H_2O Maximalwerte
1	Dextrose	440	20 000	185
2	Kochsalz	700	—	270
3	Carbamid	1 120	23 000	372
4	Globulin	1 200	1 920	382
5	Albumin	1 600	18 000	542
6	Globulin	2 300	7 600	620
7	Globulin	2 400	18 000	628

der Zellzahl am Ende des Versuches. Was aus dieser Tabelle klar hervorgeht, ist ein auffallender Parallelismus zwischen den Maximalwerten und den Eiweisszahlen, während die Zellzahlen ein hievon völlig unabhängiges Verhalten erken-

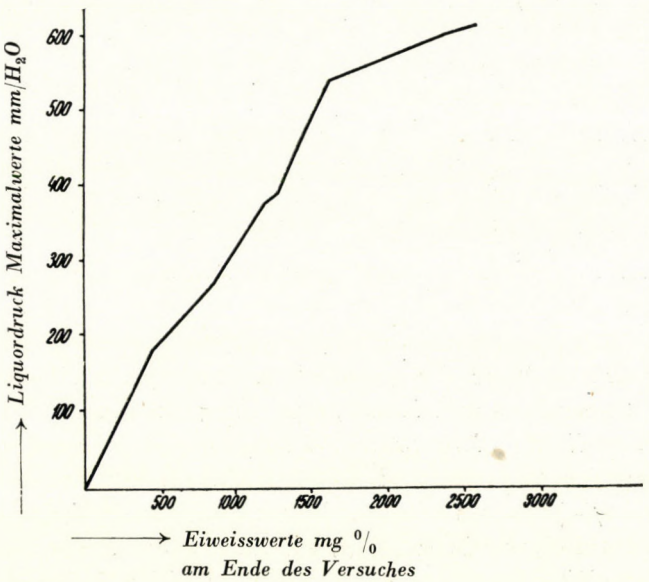


Abb. 2

nen lassen. Mit anderen Worten, die Erhöhung des Liquordruckes hängt nicht von der verabreichten, sondern von der am Ende des Versuches in dem Liquorraum vorhandenen Menge Eiweisses ab. Wird dieser Zusammenhang in Kurvenform dargestellt (Abb. 2), wobei an der Abszisse die Eiweisswerte am Ende

des Versuches in mg %, an der Ordinate die Maximalwerte der Liquordruckerhöhungen in mm/H_2O aufgetragen sind, so ist deutlich zu sehen, dass — mindestens innerhalb der untersuchten Grenzen — zwischen den beiden Werten ein fast linearer Zusammenhang besteht: d. h. für diese Werte sind die Maximalwerte der Liquordruckkurven den gleichzeitig vorhandenen Eiweisskonzentrationen direkt proportional. Am oberen Teil, also den höchsten Eiweisswerten entsprechend zeigt die Kurve eine Verflachung; dies weist darauf hin, dass in diesem Abschnitt der Kurve die Liquordruckwerte nicht mehr den Eiweisswerten direkt proportional sind. Folglich muss es betont werden, dass das soeben Dargelegte nur innerhalb von gewissen Grenzen gültig ist.

Die obigen Befunde führten uns zum Verständnis des Mechanismus der entstandenen Liquordrucksteigerungen bedeutend näher, die Frage blieb jedoch noch immer offen: wodurch erklärt sich die Tatsache, dass bei der Verschiedenheit des kolloid-osmotischen Druckes nach Albuminverabreichung fast genau dieselbe Liquordrucksteigerung zustandekommen kann, wie nach Globulinverabreichung?

TABELLE VI

Albuminversuch 10 mg/kg			*Globulinversuch 10 mg/kg*		
Liquoreiweiss am Ende des Versuches g %			Liquoreiweiss am Ende des Versuches g %		
Gesamteiweiss	2,4	2,1	Gesamteiweiss	2,1	1,7
Albumin	1,3	1,1	Albumin	1,1	0,8
Globulin	1,1	1,0	Globulin	1,0	0,9
Quotient A/G	1,18	1,1	Quotient A/G	1,1	0,9

Wir unternahmen daher eine genaue Analyse des am Ende des Versuches gewonnenen Liquoreiweisses und fanden, dass völlig unabhängig davon welcher der beiden Eiweisstoffe eingeführt wurde, am Ende des Versuches die quantitativen Verhältnisse des Albumins und des Globulins nahezu die gleichen sind; d. h. der Quotient A/G (Albumin : Globulin) zeigt immer einen Wert von nahezu 1. (S. Tabelle VI). Dadurch wurde erst klar, warum zwei Stoffe von verschiedener kolloid-osmotischer Wirkung in den Liquorraum eingeführt im wesentlichen die gleiche Liquordruckerhöhung hervorrufen können. Eine genaue Erklärung dieser auffallenden Tatsache können wir zur Zeit nicht geben. Da nach Einspritzung der erwähnten Lösungen, wie erwähnt, im Liquor eine beträchtliche Eiweissvermehrung zustande kommt, kann diese letztere selbstverständlich nur aus dem Blute infolge von Transsudation herrühren. Da weiterhin der Quotient A/G auch bei unseren Versuchstieren im Blute nahezu eins (1,1) war, scheint es uns

wahrscheinlich, dass derselbe Regulationsmechanismus, welcher im Blute den Quotienten A/G auf der Höhe von eins hält, unter Umständen auch im Liquor tätig sein kann. Es zeigt sich darin unseres Erachtens ein im Organismus bisher unbekannter feiner Regulationsmechanismus, dessen genauere Gesetzmässigkeiten durch weitere Untersuchungen zu klären wären.

Zuletzt möchten wir uns mit der Frage der auch bei unseren Versuchen vorzufindenen aseptischen Meningitis kurz befassen, insbesondere in der Hinsicht, ob nicht etwa auch ein Zusammenhang zwischen dieser und der Liquordruckerhöhung bestände? Wie das aus Tabelle V ersichtlich, stehen die angegebenen Maximalwerte der Liquordruckerhöhungen in keinem proportionellen Verhältnis mit der meningealen, d. h. entzündlichen Reaktion (Zellzahl). So sehen wir, dass z. B. zum niedrigsten Maximalwert (185 mm/H_2O) eine Zellzahl von 20 000 gehört, während eine der beiden höchsten Maximalwerten (620 mm/H_2O) die niedrigste Zellzahlvermehrung (1,760 pro ccm) zeigt. Eine ähnliche Feststellung wurde auch von *Parker* und *Lehman* (5) gemacht.

Zusammenfassung

1. Die in die Zisterne des Hundes eingeführten isotonischen, sterilen homologen, isolierten Serumproteinfraktionen (Hundeserumalbumin, bzw.-globulin) vermögen eine beträchtliche Erhöhung des Liquordruckes zu verursachen.

2. Diese Liquordruckerhöhung ist nach der Einführung von beiden Eiweissfraktionen im wesentlichen die Gleiche, obwohl der kolloid-osmotische Druck des Albumins bedeutend höher ist, als der des Globulins.

3. Unter ähnlichen Umständen eingeführte Dextranlösung ruft eine ähnliche Wirkung hervor.

4. Kleinmolekulare Stoffe (Dextrose, Carbamid, Kochsalz) in steriler, isotonischer Lösung in die Zisterne eingeführt verursachen bedeutend geringere Liquordruckerhöhung.

5. Die am Ende des Versuches vorgefundene Gesamteiweissmenge beträgt das mehrfache (etwa vierfache) der eingeführten Eiweissmengen.

6. Die Höhe der Maximalwerte der verursachten Liquordrucksteigerungen ist, innerhalb gewisser Grenzen, direkt proportional der Konzentration des am Ende des Versuches gefundenen Eiweisses.

7. Die Stärke der am Ende des Versuches anzutreffenden entzündlichen (meningealen) Reaktion ist nicht der Liquordruckerhöhung proportional.

8. Das am Ende des Versuches vorgefundene Gesamteiweiss des Liquors gestaltet sich nach gesonderter intrazisternaler Injektion jeder der zwei isolierten Hundeserumeiweissfraktionen (Albumin bzw. Globulin) derart, dass das Albumin und das Globulin in fast gleicher Menge darin vorhanden sind, d. h. der Quotient A/G (Albumin : Globulin) immer nahezu gleich 1 bleibt.

9. In den angeführten Versuchen zeigt sich unseres Erachtens ein bisher unbekannter feiner chemischer Regulationsmechanismus des Liquordruckes.

10. Wir erblicken in den Ergebnissen unserer Untersuchungen einen weiteren Beweis dafür, dass physikalisch-chemische Gesetzmässigkeiten nicht ohne weiteres auf den lebenden Organismus übertragen werden können, sondern nur unter weitgehender Berücksichtigung der Gesetzmässigkeiten der physiologischen Reaktionen.

Für die entgegenkommende Unterstützung unserer Arbeit sprechen wir Prof. *G. Ludány*, Direktor *J. Vándor*, Doz. *A. Láng*, Oberarzt *I. Szmuk*, Doz. *J. Botár*, sowie den technischen Assistenten *I. Tóth* und *N. Hajós*, unseren besten Dank aus.

LITERATUR

1. *Bagley:* Arch. Surg. **17**, 18, (1928); Arch. Surg. **17**, 39, (1928); Arch. Surg. **18**, 1078, (1929).
2. *Russel:* Brain **55**, 549, (1932).
3. *Webster* und *Freeman:* Ann. Surg. **113**, 556, (1941).
4. *Howe:* Arch. Neurol. Psych. **20**, 1048, (1928).
5. *Parker* und *Lehman:* Ann. Surg. **104**, 492, (1936).
6. *Schnedorf et al.:* Surg. Gyn. Obst. **70**, 628, (1940).

К ВОПРОСУ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ДАВЛЕНИЯ ЛИКВОРА

И. Феньеш и А. Хедри

II. Хирургическая клиника медицинского университета, Будапешт

Резюме

1. Введенные в цистерну собаки изотонические стерильные, гомологичные, изолированные белковые фракции сывороток (альбуминовая или глобулиновая сыворотка собаки) в состоянии значительно повышать давление ликвора.

2. Это повышение давления ликвора, после введения двух белковых фракций, по существу одинаковой величины, несмотря на то, что коллоидно-осмотическое давление альбумина гораздо сильнее, чем то глобулина.

3. Введенный при одинаковых условиях раствор декстрана вызывает одинаковое действие.

4. Низкомолекулярные вещества (декстроза, карбамид, поваренная соль), введенные в истерны в стерильном, изотоническом растворе, вызывают значительно меньшее повышение давления ликвора.

5. Найденные в конце эксперимента общие количества белков составляют многократное (четырехкратное) введенного количества белков.

6. Концентрация найденного в конце эксперимента белка, — внутри известных пределов, — прямо пропорциональна высоте максимальных величин вызванных повышений давления ликвора.

7. Сила воспалительной (менингеальной) реакции, встречаемой в конце эксперимента, не пропорциональна повышению давления ликвора.

8. После обособленной внутрицистернальной инъекции каждой из двух изолированных фракций сыворотки белка собаки (альбумин или же глобулин), общее количество белка, выявляемое в конце эксперимента, образовывается таким образом, что в нем альбумин и глобулин находятся почти в равном количестве, т. е. коэффициент А/Г (альбумин-глобулин) почти всегда равняется единице.

9. По мнению авторов в вышеприведенных экспериментах проявляется доныне еще неизвестный тонкий химический механизм регуляции давления ликвора.

Pharmacologia

PRÜFUNG DER ANALGETISCHEN WIRKUNG UND DER GEKREUZTEN GEWÖHNUNG AN DIE ANALGETIKA BEI RATTEN

Von

J. FÓRSZÁSZ, L. TARDOS, F. HERR, M. NYIRI

PHARMAKOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen: am 30. Mai 1952)

Zur Messung der Wirkung analgetischer Mittel an Ratten ist eine grosse Reihe von Versuchen angegeben worden. Die grösste Verbreitung unter diesen gewann die Methodik von *D'Amour* und *Smith* (1), die darin besteht, dass der mit Tusche geschwärzte Rattenschwanz mit Wärme bestrahlt und die bis zum Wegreissen des Schwanzes vergangene Zeit gemessen wird. Diese Methode ist eigentlich eine Übertragung auf die Ratte der von *Hardy*, *Wolff* und *Goodell* (2) für die menschliche Stirnhaut ausgearbeiteten Methode. Das Verfahren von *D'Amour* und *Smith* wurde von *Thorp* (3), *Davies*, *Raventos* und *Walpole* (4), *Hougs* und *Ollson* (5), *Ercoli* und *Lewis* (6) mehr oder weniger modifiziert. Der gemeinsame Nachteil dieser Methoden liegt darin, dass die hohe Wärme am Schwanz der Tiere leicht Brandwunden erzeugen kann und dass alle diese Verfahren eine ziemlich komplizierte Einrichtung erfordern.

In einer früheren Arbeit hatten wir (7) eine zur Messung der analgetischen Wirkung an Mäusen geeignete Methodik mitgeteilt. Hierbei wird der Schmerz durch Kontaktwärme in jener Weise erzeugt, dass wir die Maus unter einem Glassturz auf eine auf 53 C° erwärmte Blechplatte legen und als Kriterium der Schmerzempfindung das Belecken der einen Pfote betrachten. Nach Verabfolgung analgetischer Mittel tritt das Belecken der Pfote später auf und die Zeitverlängerung ist mit der Dosis des benützten Pharmakons proportionell. Das Verfahren besitzt den grossen Vorteil, dass die hierzu notwendige Apparatur schnell zusammengestellt werden kann, die Tiere keine Schädigung erleiden, und eine grosse Zahl von Messungen leicht und schnell auszuführen ist, wodurch die Ergebnisse auch statistisch ausgewertet werden können. Das letztere ist von grosser Bedeutung, wenn wir die dem Schmerzreiz gegenüber gezeigten individuellen Differenzen der Empfindlichkeit in Betracht ziehen.

Dieses Verfahren schien auch bei Ratten brauchbar zu sein, womit ausser den erwähnten noch die folgenden Gesichtspunkte notwendig werden. Die

Prüfung der Gewöhnung an die analgetischen Mittel ist bei Mäusen mit grossen Schwierigkeiten verbunden, da sie während der langwierigen Behandlung leicht zugrunde gehen, dagegen wird von den Ratten sogar eine mehrmonatige Behandlung gut vertragen (8). Ausserdem besteht die Möglichkeit festzustellen, ob bezüglich der Wirkungsstärke der verschiedenen Analgetika, mit der gleichen Methode gemessen, ein Unterschied zwischen Maus und Ratte vorhanden ist. Die Übertragung der Methode auf Ratten schien auch deswegen notwendig zu sein, weil jene Eingriffe, die zur Feststellung der zentralen Lokalisation der dem Schmerzreiz folgenden Abwehrbewegungen (Belecken der Pfote) notwendig sind (Dekortikation), an Mäusen sehr schwer ausgeführt werden können.

Beschreibung der Methodik

Das zur Schmerzerzeugung mittels Kontaktwärme von uns benützte Gerät ist bei den Ratten dasselbe, wie das früher in der Mäusemethodik beschrieben ist, nämlich ein von allen Seiten geschlossener, wassergefüllter Blechzylinder von 20 cm Höhe und 25 cm Durchmesser. Die obere Deckplatte des Zylinders ist völlig glatt und am Rande mit zwei nebeneinander liegenden Öffnungen versehen. In eine derselben setzten wir behufs Füllung des Gefässes mit Wasser eine nach oben trichterförmig sich erweiternde Glasröhre von 30 cm Höhe und 0,7 cm Durchmesser. In die andere Öffnung wird ein Thermometer zur Messung der Temperatur der Deckplatte angebracht. Diese stimmt nur dann mit der Wassertemperatur überein, wenn der Zylinder luftleer ist. Das ganze wird von unten mit einer Glasflamme gewärmt. Auf das Dach des Zylinders legen wir die Ratte unter einen Glassturz von 18 cm Durchmesser und 8 cm Höhe. Auf den unteren Rand des Sturzes montierten wir, um das Einklemmen des Schwanzes zu verhüten, drei je ein cm hohe Gummifüsse. Das Verhalten der Ratten an der heissen Platte ist sehr charakteristisch. Sie laufen im Kreis herum, schütteln ihre Beine, dann lecken sie an ihren Pfoten. Das letztere wurde deshalb zum Zeichen der Schmerzempfindung gewählt, weil das Pfotenlecken an zimmerwarmer oder noch kälterer Platte nie in Erscheinung tritt. Tiere, die auf die Wärmewirkung mit keinem, oder erst nach längerer Zeit erfolgtem Pfotenlecken reagierten, schlossen wir von den weiteren Versuchen aus. Die von dem Auflegen auf die Platte bis zum Pfotenlecken verflossene Zeit wurde mit Stopperuhr gemessen und als normale Schmerzreaktionszeit (NRZ) bezeichnet. Vor und während der Untersuchung hielten wir die Tiere, damit ihre Sohlentemperatur gleichmässig bleibe, zu zweit in sägemehlgefüllten Gläsern.

Ausarbeitung der Methode

Zur Untersuchung der analgetischen Wirkung verwandten wir einen Wärmereiz von 56 C°. An dieser Temperatur schwankt der Mittelwert der normalen Schmerzreaktionszeit in den aus je 10 Tieren bestehenden Gruppen

zwischen 8—12 Sekunden. Um eine analgetische Wirkung nachweisen zu können, ist es von grosser Wichtigkeit, dass in den NRZ-en im Verhältnis zu den Anfangswerten keine signifikante Zeitverlängerung entstehe.

Die signifikante Differenz wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$Sd = \frac{M_2 - M_1}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}{n - 1}}}$$

wo M_1 den Mittelwert der in der 0′ Minute gemessenen, M_2 den Mittelwert der in der 30, 60 oder 90 Minute gemessenen NRZ bedeutet.

In zwanzig aus je 10 Tieren bestehenden Gruppen fanden wir keine einzige signifikante Verlängerung der NRZ, können daher mit Recht behaupten, dass die signifikante Verlängerung der NRZ bei Anwendung eines Pharmakons der Wirkung des untersuchten Mittels zuzuschreiben ist, demnach das Verfahren zur Auswertung der analgetischen Wirkung geeignet erscheint. Wir fassten unsere Ergebnisse in Tabellen zusammen. Tabelle I zeigt die in 30′ Intervallen gemessenen Änderungen der NRZ von zehn Ratten, Tabelle II die Änderungen der NRZ in zwanzig, je 10—10 Ratten enthaltenden Gruppen.

TABELLE I

Änderungen der Normalreaktionszeit (NRZ) von Ratten halbstündlich gemessen bei 56 C°

Nr	Körpergewicht in gr	Beobachtungszeit in Sekunden			
		0'	30'	60'	90'
1	110	8,0	5,0	6,2	5,0
2	180	9,0	11,8	16,8	13,2
3	225	5,8	9,8	7,2	10,2
4	175	16,2	12,2	13,2	7,2
5	140	12,8	12,8	11,8	10,2
6	160	9,8	10,2	6,0	7,0
7	280	14,8	14,2	10,2	13,8
8	170	12,2	12,4	11,2	9,4
9	310	5,0	5,8	6,2	4,8
10	220	16,8	5,4	15,2	10,2
	Mittelwert:	11,04	9,96	10,4	9,1

Messung der Wirkung analgetischer Mittel und Auswertung der Ergebnisse

Wir untersuchten die Wirkung von Morphin, Dolantin, Methadon, Hexalgon, Amidazophen und Acidum acetylosalicylicum. Die Verbindungen wurden auf Körpergewicht gerechnet in 0,9% NaCl gelöst subkutan verabfolgt. Die Wirkung sämtlicher Dosen jedes einzelnen Mittels wurde in vier, aus je 10 Tieren

TABELLE II

Änderungen der normalen Schmerzreaktionszeit von 200 Ratten halbstündlich gemessen

Gruppenzahl 10—10 Tiere	Normalreaktionszeit (NRZ) sec.				Grösste Zeitverlängerung in % en im Verhältnis zu 0′	Signifikante Differenz	Grad der Analgesiein analgetischen % ten
	0′	30′	60′	90′			
1	11,04	9,96	10,04	9,1	—	—	—
2	11,3	10,7	11,3	6,98	—	—	—
3	10,7	7,78	6,25	6,76	—	—	—
4	8,62	9,39	9,96	12,58	45,9	1,5	30,63
5	9,28	7,7	7,12	6,44	—	—	—
6	10,5	9,84	12,26	12,2	16,19	0,7	11,17
7	9,13	7,68	8,8	7,88	—	—	—
8	8,88	11,61	8,12	6,62	30,72	1,8	20,65
9	8,72	7,52	9,3	8,44	6,65	0,03	4,43
10	8,14	10,6	8,6	10,8	32,67	1,5	20,72
11	6,69	7,42	6,83	8,45	26,3	1,3	15,5
12	7,46	7,28	8,7	8,89	19,17	1,08	12,78
13	7,42	8,66	7,49	8,19	16,71	0,03	11,14
14	6,32	7,35	6,62	6,1	16,29	0,8	10,87
15	8,34	6,61	8,4	7,42	0,72	—	—
16	5,84	7,62	5,43	6,33	30,49	0,98	20,2
17	8,78	8,96	7,46	8,98	2, 8	0,02	1,55
18	10,92	11,66	12,18	8,3	11,54	0,01	7,69
19	11,3	11,15	10,00	9,5	—	—	—
20	10,18	10,14	9,76	8,92	—	—	—
Durchschnittswert	9,28 ± 1,5	8,98 ± 1,85	8,7 ± 1,868	8,54 ± 1,79			

bestehenden Gruppen geprüft. Weniger als 10 Tiere enthaltende Gruppen sind für den Nachweis der analgetischen Wirkung unbrauchbar. Die analgetische Wirkung wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\% = \frac{100 \times (\mathrm{ARZ} - \mathrm{NRZ})}{\max \mathrm{ARZ} - \mathrm{NRZ},}$$

wo ARZ die analgetische Schmerzreaktionszeit, NRZ die normale Schmerzreaktionszeit, max ARZ die 2,5-fache NRZ, d. h. jene Zeitverlängerung in Sekunden bedeutet, welche das 2,5-fache des Mittelwertes der NRZ von 10 Tieren ist. Wird diese Zeit auf die analgetische Wirkung von jedem Tier erreicht, so sprechen wir von einer 100% igen analgetischen Wirkung. Wir möchten aber betonen, dass es möglich wäre die maximale ARZ in irgend einem anderen

mehrfachen Wert der NRZ zu bestimmen, ohne dass sich das gegenseitige Verhältnis in der Wirkung der Analgetika ändern würde.

Wenn wir die grösste Zeitverlängerung unter den in der Tabelle II angegebenen Zahlen in »analgetische Prozenten« auswerten, so beträgt die erreichte maximale Streuung in zwanzig, je 10 Ratten enthaltenden Gruppen 30,6% (Rubrik 8 der Tabelle). Demzufolge können wir — bei Anwendung von 10 Tieren in einer Gruppe — in der Auswertung der schmerzstillenden Wirkung einer Verbindung geringere Werte nicht als Analgesie betrachten.

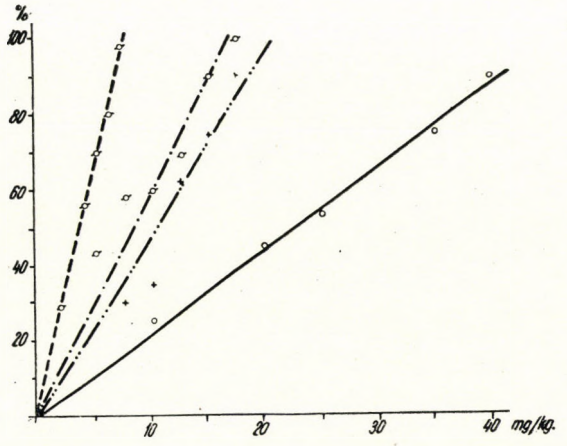


Abb. 1. Methadon, Morphin, Hexalgon, Dolantin Dosis Wirkungskurve
— — — — — Methadon
—.—.—.—.— Morphin
—..—..—..— Hexalgon
———————— Dolantin

Nach dem gleichen Berechnungsmodus wurde in der Abb. 1. die Wirkung folgender Dosen der verschiedenen Verbindungen auf die Analgesie dargestellt:

Morphin	5,0	7,0	10,0	12,5	15,0	mg/kg
Methadon	2,0	4,0	5,0	6,0	7,0	„
Dolantin	10,0	20,0	25,0	35,0	40,0	„
Hexalgon	7,5	10,0	12,5	15,0	17,5	„

Wenn wir die schmerzstillende Wirkung des Morphins für 1 nehmen, so ist für die Erzielung einer gleich starken analgetischen Wirkung von Methadon eine 0,42-mal, von Hexalgon eine 1,26-mal, von Dolantin eine 2,77-mal grössere Dosis erforderlich. Ein Vergleich der Ergebnisse mit den entsprechenden Literaturdaten ist in Tabelle III ersichtlich.

Untersuchung der analgetischen Wirkung vom Amidazophen und Aspirin

Die analgetische Wirkung des Amidazophens konnte bisher in Tierexperimenten nur in sehr hohen toxischen Dosen nachgewiesen werden. So konnten z. B. *Wolfe* und *McDonald* (11) die Wirkung von 300 mg/kg unter zehn Mäusen nur an sechs nachweisen. *Davies* (4) erzielte an der Ratte nur durch 169 mg/kg i. v. die 2,2 mg/kg Mo entsprechende Wirkung, somit war für dieselbe analgetische Wirkung eine 77-mal grössere Dosis erforderlich.

TABELLE III

Analgetische Wirkungsstärke von Methadon, Hexalgon, Dolantin im Verhältnis zum Morphin

Autor	Morphin	Methadon	Hexalgon	Dolantin	Bemerkung
Schaumann	1	—	—	0,07	Maus sc. (10.)
Haffner				0,1	
Wolfe				1,16	Maus sc. (11.)
McDonald	1	—	—	0,2	
Scott					Hund sc. (13.)
Chen	1	2,1	—	—	
Thorp	1	1,3	—	—	Ratte sc. (14.)
Tainter	1	3,4	—	—	Mensch sc. (15.)
Ollson	1	1,28	—	—	Ratte sc. (5)
Herr	1	1,4	0,7	0,17	Maus sc. (12.)
Pórszász					
Pórszász	1	1,4	0,73	0,28	Maus sc. (7.)
Herr					
Davies	1	—	—	0,48	Ratte i. v. (4.)
Pórszász					
Tardos	1	2,39	0,79	0,36	Ratte sc.
Herr					

Bei der Untersuchung der analgetischen Wirkung des Amidazophens an Ratten beobachteten wir bei subkutaner Injektion von 80 mg/kg eine 35% ige, von 100 mg/kg eine 49% ige und von 150 mg/kg eine 74% ige Wirkung. Nach unseren Berechnungen wirkt demnach das Amidazophen an Ratten 13-mal schwächer, als das Morphin. Die Erklärung der verschiedenen Ergebnisse liegt nach unserer Meinung darin, dass sowohl *Wolfe* und *McDonald*, wie *Davies* viel stärkere Schmerzreize verwendeten, als wir. Wenn wir auch die Ergebnisse von *Knoll* und *Komlós* berücksichtigen, die an Mäusen festgestellt hatten, dass

schwache Analgetika milden Schmerzreizen gegenüber verhältnismässig stärker wirken, so können wir behaupten, dass wir eine analgetische Wirkung schon mit 80 mg/kg deshalb erzielen konnten, weil wir verhältnissmäsig milde Schmerzreize verwendeten. Nichtsdestoweniger erwies sich das Aspirin bei unserem Verfahren überhaupt nicht analgetisch wirkend. Es ist interessant, dass *Davies* (4) mit 490 mg/kg i. v. verabfolgtem Aspirin eine analgetische Wirkung nachweisen konnte, obwohl er sich der einen viel stärkeren Schmerzreiz bedeutenden Wärmebestrahlungsmethode bediente. Unseres Erachtens ist aber diese Dosis schon so stark toxisch, dass man hier von einer spezifischen analgetischen Wirkung nicht mehr reden kann.

Zusammenfassend können wir feststellen, dass unsere Methode zur Messung der analgetischen Wirkung gut geeignet ist, die Tiere durch den Wärmereiz nicht schädigt und die verschiedenen Dosen der Analgetika von einander gut differenziert (Abb. 1), somit alle Forderungen einer idealen Methode erfüllt (17, 18).

II.

Es ist eine allgemein bekannte Tatsache, dass bei langer, ununterbrochen fortgesetzter Verabfolgung eines Analgetikums nach einiger Zeit — mit Ausnahme der tonussteigernden und das Brechzentrum lähmenden Wirkung des Vagus — eine Gewöhnung an das Mittel zustande kommt. Es stellt sich die Frage, wie sich der Organismus in solchen Fällen zu analgetischen Mitteln ähnlicher Wirkung, aber anderer Struktur verhält. Solche gekreuzte Angewöhnungsversuche wurden von *Myers* (19) ausgeführt, der festgestellt hat, dass bei Hunden, die an die respirationslähmende Wirkung des Morphins gewöhnt wurden, Codein und Heroin keine Respirationslähmung erzeugen, während Chloralhydrat noch in normaler Weise wirkte. *Himmelsbach* (20) untersuchte die gekreuzte Angewöhnung derart, dass er nach solchen Verbindungen geforscht hat, welche die Symptome der Morphinentziehung zu mildern vermögen. Er stellte fest, dass nur jene Verbindungen eine solche Wirkung entfalten, die selbst eine Angewöhnung erzeugen.

Wir fanden in der Literatur keine Angaben darüber, in welcher Weise die gekreuzte Gewöhnung an die analgetische Wirkung zustande kommt, deshalb machten wir dieses Problem mit unserer oben beschriebenen Methode zum Gegenstand der Untersuchung.

Methodik

Wir verwendeten für unsere Versuche 150—220 g schwere weisse Ratten. Die Tiere wurden in drei Gruppen geteilt, mit je 14 Ratten in einer Gruppe. Die Injektionen haben wir auf Körpergewicht gerechnet täglich einmal subkutan

verabfolgt und die analgetische Wirkung im allgemeinen in siebentägigen Intervallen gemessen. Wir prüften die Wirkung von Morphin (Mo), Methadon (Me) und Hexalgon (He) (9). Der Gang des Versuches war der folgende : Wir bestimmten jene Dosen der drei Verbindungen, deren analgetische Wirkungsstärke identisch war. Eine 70—80% ige analgetische Wirkung wird von 8 mg/kg Mo, 4 mg/kg Me und 12 mg/kg He ausgeübt. Eine Tiergruppe erhielt solange das Analgetikum, bis die Gewöhnung an das Mittel eingetreten war. In diesen Fällen suchten wir zu ermitteln, inwiefern die Empfindlichkeit des Tieres den anderen zwei Analgetika gegenüber verändert war. Nun setzten wir die Behandlung mit einem anderen Analgetikum solange fort, bis sich das Tier auch an dieses gewöhnt hat, wonach die Reaktion der Ratten noch einmal gegen alle drei Analgetika geprüft wurde. Den zweiten Gewöhnungsversuch führten wir schon nicht mit der ursprünglichen 70—80% igen analgetischen Dosis aus, da diese in der Regel schwächer wirkte, sondern mit um 25—30% erhöhten Dosen. Das Schema unserer Versuche ist demnach das folgende ;

Gruppe	I.	Behandlung	Mo	Nachuntersuchung	Me	He	Weiterbehandlung		He
«	II.	«	Me	«		He	«		He
«	III.	«	He	«	Mo	He	«		Mo

Mit Rücksicht darauf, dass in einer Gruppe nur 14 Ratten verwendet wurden, können die prozentuellen Werte der Analgesie erst bei einer 20% übersteigenden Abweichung verwertet werden.

Ergebnisse

Die in den einzelnen Gruppen gewonnenen Ergebnisse stellten wir in Tabellen zusammen. In Tabelle IV sind die Resultate der das erste mal mit Mo, in Tabelle V der mit Me, in Tabelle VI der mit He behandelten Ratten dargestellt.

Die Ratten gewöhnen sich in 35 Tagen an die analgetische Wirkung von täglich einmal verabfolgtem 8 mg/kg Mo. Zu dieser Zeit trat aber noch keine Gewöhnung an 12 mg/kg He ein und auch die analgetische Wirkung von 4 mg/kg Me war nur wenig geschwächt. Diese Tiere bekamen vom 38. Tag an 14 mg/kg He, aber auch die analgetische Wirkung dieses Mittels hörte am 108. Tage auf. In diesem Zeitpunkt hatte das doppelte der ursprünglichen Morphingabe (16 mg/kg) überhaupt keinen Einfluss mehr auf die Schmerzempfindung. Auch 4 mg/kg Me hatte keine analgetische Wirkung, obwohl die Tiere bis dorthin mit Me nicht behandelt wurden. Um 50% erhöhte Methadondosen wirkten aber noch immer, wenn auch schwächer, als an normalen Tieren 4 mg/kg.

Die Gewöhnung an 4 mg/kg Me tritt nach einer zweimonatigen Behandlung auf. Die He-Wirkung ist zu dieser Zeit geschwächt. Wir setzten die He-Behandlung fort und am 100. Tage hatte schon nicht einmal 14 mg/kg He eine analgetische Wirkung. Während dieser Zeit erhielten die Tiere überhaupt kein

TABFLLE IV

Ergebnisse bei den zuerst mit Morphin behandelten Ratten

Zahl der Behandlungstage	Analgetikum	Dosis mg/kg	Analgesie in % en	Bemerkung
	He	12	70	
	Me	4	78	
1	Mo	8	75	
7	Mo	8	50	
14	Mo	8	50	
21	Mo	8	50	bis zum 38. Tag
28	Mo	8	50	Tagesdosis 8 mg/kg Mo sc.
35	Mo	8	0	
36	He	12	75	
37	Me	4	58	
38	Mo	8	0	
41	He	14	83	
46	He	14	40	
48	He	14	30	
62	He	14	65	vom 38. bis 108. Tag
65	He	14	45	Tagesdosis 14 mg/kg Ho sc.
85	He	14	40	
91	He	14	45	
98	He	14	40	
105	He	14	40	
108	He	14	0	
114	Mo	8	0	
115	Mo	12	0	
116	Me	4	0	
117	Me	6	48	
118	Mo	16	0	

Me, aber ihre Empfindlichkeit kehrte nicht zurück. 4 mg/kg Me war wirkungslos und auch 6 mg/kg erzeugte nur eine 65% ige Analgesie. An den selben Tieren hatte nicht einmal 12 mg/kg Mo Einfluss auf die Schmerzempfindung, obwohl sie mit Mo überhaupt nicht behandelt wurden. Amidazophen erzeugte aber auch jetzt die gleich starke Analgesie, wie an normalen Tieren.

Hier begannen wir die Behandlung mit He, und die Gewöhnung an 12 mg/kg stellte sich am 36. Tag ein. Auf die Wirkung dieser Behandlung erfolgte nur eine geringe Gewöhnung an Mo und Me. Nach weiterer Behandlung mit 12 mg/kg Mo trat die Gewöhnung am 100. Tage auf und zu dieser Zeit hatte in der ursprüng-

TABELLE V

Ergebnisse bei den zuerst mit Methadon behandelten Ratten

Zahl der Behandlungstage	Analgetikum	Dosis mgk/g	Analgesie in %-en	Bemerkung
	Mo	8	75	
	He	12	70	
1	Me	4	78	
7	Me	4	70	
14	Me	4	78	
21	Me	4	48	bis zum 59. Tag
28	Me	4	48	Tagesdosis 4 mg/kg Me sc.
35	Me	4	50	
45	Me	4	55	
53	Me	4	38	
58	Me	4	0	
59	He	14	50	
60	He	16	50	
75	He	14	68	vom 59. bis 118. Tag
92	He	14	55	Tagesdosis 14 mg/kg He sc.
100	He	14	0	
118	He	14	0	
121	Me	4	0	
122	Me	6	65	
123	Mo	8	0	vom 118. bis 121. Tag
124	Mo	12	0	Tagesdosis 14 mg/kg He sc.
125	Me	8	78	vom 125. bis 130. Tag
130	Amidazophen	150	80	Tagesdosis 14 mg/kg He sc.

lichen Dosis schon keines der drei Analgetika eine schmerzstillende Wirkung. Die um 50% erhöhte Me-Dosis hatte eine 43% ige, die doppelte der anfänglichen He-Dosis: 24 mg/kg eine 98% ige analgetische Wirkung. Mit dieser Dosis wurden die Tiere 130 Tage behandelt, aber eine weitere Gewöhnung an diese Dosis kam nicht mehr zustande.

Zusammenfassend ist folgendes festzustellen. Wenn die Tiere sich an ein bestimmtes Analgetikum gewöhnt haben, so üben noch die anderen zwei Mittel, wenn auch in geringerem Masse, eine analgetische Wirkung aus. Wenn die Tiere in diesem Zustand mit einem zweiten Analgetikum weiter behandelt werden, so gewöhnen sie sich an dieses in der selben Zeit, oder noch später, als in dem Falle, wenn sie dieses Mittel zuerst bekommen hätten. Nach der Gewöhnung an das

TABELLE VI

Ergebnisse bei den zuerst mit Hexalgon behandelten Ratten

Zahl der Behandlungstage	Analgetikum	Dosis mg/kg	Analgesie in %-en	Bemerkung
	Mo	8	72	
	Me	4	75	
1	He	12	70	
7	He	12	80	
14	He	12	65	bis zum 58. Tag
25	He	12	88	Tagesdosis 12 mg/Kg He sc.
33	He	12	65	mit Ausnahme des 53. und 54
38	He	12	0	Tages
45	He	12	0	
53	Mo	8	43	
54	Me	4	61	
58	Mo	12	35	
59	Mo	12	48	
65	Mo	12	30	vom 59. bis 130. Tag
70	Mo	12	30	Tagesdosis 12 mg/kg Mo sc.
75	Mo	12	55	
90	Mo	12	35	
100	Mo	12	0	
110	Mo	12	0	
120	Mo	12	0	
125	Mo	12	0	
131	He	12	0	
132	He	18	65	
133	Me	4	0	
134	Me	6	43	vom 135. bis 264. Tag
135	He	24	98	Tagesdosis 24 mg/kg He sc.
160	He	24	75	
200	He	24	100	
235	He	24	70	
265	He	24	70	

zweite Analgetikum hat in der ursprünglichen Dosierung bereits keines der drei Analgetika eine analgetische Wirkung. Es entwickelt sich also eine Gewöhnung auch an solche Analgetika, mit denen die Tiere überhaupt nicht behandelt wurden. Die Gewöhnung ist also gegenseitig, aber nur bis zu einer gewissen Grenze, da höhere Dosen noch wirksam bleiben. Bei der Behandlung der Tiere

mit morphinartigen Verbindungen entsteht keine gekreuzte Gewöhnung an Amidazophen.

Von den untersuchten Analgetika entwickelt sich die Gewöhnung an Methadon am langsamsten, zu welcher eine zweimonatige Behandlung notwendig war. Wir untersuchten an zwei Tiergruppen die Frage, inwiefern der Zeitpunkt der Gewöhnung durch täglich zweimalige Verabfolgung der Verbindungen verändert wurde und fanden, dass bei dieser Behandlungsweise die Gewöhnung an Mo bereits nach 25, an He nach 30 Tagen zustande kommt

Besprechung der Ergebnisse

Mit dem Mechanismus der Gewöhnung hatte sich eine ganze Reihe von Autoren beschäftigt. Nach *Faust* (21) wird vom täglich verabfolgten Morphin immer weniger im Kot ausgeschieden ; dies erklärt er damit, dass das Morphin im Organismus einer sich immer steigernden Zersetzung anheimfällt. *Rübsamen* (22) und *Takayanagi* (23, 23*a*) halten für die Gewöhnung die Speicherung des Morphins verantwortlich. *Issekutz* (24) hat festgestellt, dass das Morphin vom Hundeorganismus am Anfang der Gewöhnung schneller ausgeschieden und erst nachher gespeichert wird. Gleichfalls beobachtete *Zauder* (25) an Ratten in den ersten zwei Wochen der Mo-Gewöhnung eine vermehrte Ausscheidung. *Keeser*, *Oelkers* und *Raetz* (26) konnten einen erhöhten Abbau des Mo nicht nachweisen, stellten aber seine vermehrte Speicherung fest. *Pierce* und *Plant* (27) untersuchten bei Mo-Gewöhnung die Menge des mit dem Kot ausgeschiedenen Mo und fanden darin gegen die nicht an Mo gewöhnten Tiere keinen Unterschied, nach *Schmidt* und *Livingstone* (28) dauert die Gewöhnung nur so lange, bis der Körper Mo enthält. Die Untersuchungen von *Hatcher* und *Gold* (29) haben erwiesen, dass am Anfang der Gewöhnung eine Speicherung nachweisbar ist, diese nimmt aber nach einem gewissen Gleichgewichtszustand nicht mehr zu. Er glaubt die Gewöhnung vielmehr mit dem vermehrten Abbau des Mo erklären zu können. *Gross* und *Thompson* (30) haben festgestellt, dass sowohl die an das Analgetikum gewöhnten wie die nicht gewöhnten Hunde 20% vom verabfolgten Morphin in freier Form mit dem Urin ausscheiden, während die Menge des in gebundener Form ausgeschiedenen, sogenannten »konjugierten« Morphins im Laufe der Behandlung abnimmt. *Zauder* hatte bei Ratten ähnliche Erfahrungen gemacht und zieht aus seinen Versuchen die Folgerung, dass das Morphin im Organismus immer mehr zersetzt wird. Nicht die Leber — wie es viele angenommen hatten — sondern extrahepatische Faktoren sind für den vermehrten Abbau verantwortlich. Wie es aus den Gesagten hervorgeht, glauben die Autoren die Morphingewöhnung entweder mit seinem vermehrten Abbau, oder seiner Speicherung im Organismus erklären zu können, wodurch die Wirkung des neu eingeführten Morphins gehemmt wird.

Die Erklärung der Gewöhnung an die analgetischen Mittel wurde durch die Versuche mit den synthetischen Analgetika in neue Beleuchtung gesetzt. *Rickards* und seine Mitarbeiter (31) untersuchten mit einer sehr empfindlichen analytischen Methode den Metabolismus des Methadons an normalen und an das Mittel gewöhnten Ratten und fanden, dass das Me in den an seine analgetische Wirkung gewöhnten Tieren (15 mg/kg) nicht gespeichert wird, ja die untersuchten Organe, unter ihnen auch das Gehirn, viel weniger vom Mittel enthielten, als die Organe der Kontrolltiere. Sie wiesen auch nach, dass die Zersetzung des Me während der Gewöhnung nicht zunimmt und nur seine Verteilung im Organismus eine Änderung erfahrt. Demnach ist die Gewöhnung weder mit vermehrter Speicherung, noch mit vermehrter Zersetzung zu erklären. *Way* und seine Mitarbeiter (32) waren auch nicht imstande eine vermehrte Me-Speicherung nachzuweisen. Sie bestimmten an Ratten, die acht Tage lang mit einer 3×5 mg/kg Tagesdosis behandelt wurden, vier Stunden nach der letzten Dosis den Me-Gehalt der Organe und fanden, dass seine Grössenordnung mit der der Kontrolltiere identisch ist.

Ausserdem stellten sie fest, dass das verabfolgte Me im Organismus sowohl der normalen, als der an das Mittel gewöhnten Ratten in etwa vier Stunden beinahe vollständig abgebaut wird. Dieselben Autoren gelangten bei Untersuchungen des Dolantins zu einem ähnlichen Ergebnis.

In unseren Untersuchungen fanden wir, dass die Ratten mit Me-Behandlung an das Mo gewöhnt werden können und auch gegen Me werden die Tiere unempfindlich, wenn wir sie längere Zeit mit Mo oder He behandeln. Nach den oben angeführten Literaturdaten wird das Mo im Körper während der Gewöhnung gespeichert und gleichzeitig stärker metabolisiert, wogegen bei Me keiner dieser Faktoren nachweisbar ist. Wir sind daher zur Folgerung berechtigt, dass sowohl der vermehrte Abbau, als die vermehrte Speicherung weder in der von uns gefundenen gekreuzten Gewöhnung, noch in der Gewöhnung an die einzelnen Analgetika eine wesentliche Rolle spielen kann.

Bekanntlich übt das N-allyl-normorphin eine dem Morphin antagonistische Wirkung aus (34—35). Neuere Autoren haben bewiesen, dass das N-allyl-normorphin nicht nur die Wirkung des Mo und der Mo-Derivate, sondern auch die der synthetischen Analgetika (Me, Dolantin) verhindert (36—37). Nach *Wikler* (36) ist es nicht ausgeschlossen, dass die Ursache der Gewöhnung im Entstehen von anti-Morphin-Stoffen im Körper liege. Unseres Erachtens wäre es vielleicht möglich die Morphingewöhnung mit dieser Hypothese zu erklären, aber z. B. im Falle von He ist die Bildung vom N-allyl-norhexalgon auch chemisch ein Ding der Unmöglichkeit. Desgleichen stösst die Erklärung der Entziehungssymptome auf Schwierigkeiten, wenn wir die Ursache der Gewöhnung mit »Antimorphin« erklären wollen.

Nach dem Gesagten ist also zur Erklärung der Gewöhnung keine der oben erwähnten Theorien geeignet. Wir müssen annehmen, dass in den Zellen des

zentralen Nervensystems, wo das Morphin und seine Derivate analgetisch wirken, irgend eine feinere biochemische Veränderung entsteht, wodurch sie gegen die am selben Angriffspunkt wirkenden Analgetika unempfindlich werden. Das Amidazophen aber, welches einen anderen Angriffspunkt besitzt, enfaltet auch in diesem Falle seine Wirkung. Schon *Schübel* (39) hatte nachgewiesen, dass die Zusammensetzung der Bestandteile des Zentralnervensystems während der Gewöhnung eine Änderung erleidet. *Cloetta* (40) wies auf die Möglichkeit einer zellulären Unempfindlichkeit hin. Nach *Dongens* spielt in der Gewöhnung ebenfalls die Immunität der Gewebe eine Rolle. *Gorovoj—Saltan* (41) glauben die Gewöhnung ebenfalls mit der Mo-Unempfindlichkeit der Gehirnzellen erklären zu können. Obwohl neuerdings *Zauder* erwiesen hat, dass der Änderung im Linolensäuregehalt des Gehirns keine Rolle in der Gewöhnung zuzuschreiben ist, schliesst diese Tatsache die Möglichkeit nicht aus, dass andere biochemische Veränderungen im Mechanismus der Gewöhnung eine Rolle haben können.

In praktischer Beziehung lässt sich aus unseren Versuchen die Folgerung ziehen, dass man morphinartige Analgetika längere Zeit hindurch nicht verabfolgen kann, ohne dass sich überhaupt keine Gewöhnung an die Mittel entwickeln würde.

Zusammenfassung

1. Wir arbeiteten eine Methode zur Untersuchung der Wirkung analgetischer Mittel an Ratten mit Anwendung von Kontaktwärme aus.

2. Wir verglichen mittels unserer Methode die analgetische Wirkung vom Morphin, Methadon, Hexalgon und Dolantin. Wenn die analgetische Wirkung vom Morphin für 1 genommen wird, so beträgt die Verhältniszahl von Methadon, Hexalgon und Dolantin 2,39, 0,79 und 0,36. Amidazophen wirkt an Ratten 13-mal schwächer als Morphin.

3. Unser Verfahren erfüllt alle Bedingungen einer idealen Methodik zur Feststellung der Analgesie.

4. Wir stellten mit unserer Methode fest, dass bei den Tieren im Anschluss an die Morphin-Methadon und Hexalgon-Analgesie eine gekreuzte Gewöhnung entsteht, was bei Amidazophen nicht der Fall ist.

5. Die gekreuzte Gewöhnung entwickelt sich auch dann einem dritten Analgetikum gegenüber, wenn es überhaupt nicht verabfolgt wurde, sondern das Tier nur die zwei anderen Mittel erhielt.

6. Ist die Gewöhnung an ein Analgetikum schon eingetreten und wird dann die Behandlung mit einer anderen Verbindung solange fortgesetzt, bis sich der Organismus auch an diese völlig gewöhnt hat, so gewinnt das zuerst verabfolgte Mittel seine analgetische Wirkung nicht zurück.

7. Unsere Ergebnisse zeigen, dass man Analgetika längere Zeit hindurch nicht einmal abwechselnd verabfolgen kann, ohne dass eine Gewöhnung entstünde und dass die Dosen infolgedessen nicht erhöht werden müssten.

LITERATUR

1. *D'Amour, F. E., Smith, D. L.:* J. of Pharmacol. and Exp. Ther. **72**, 74 (1941).
2. *Hardy, J. D., Wolff, H. G., Goodell, H.:* J. Clin. Invest. **19**, 649 (1940).
3. *Thorp, R. H.:* Brit. J. of Pharm. **1**, 113 (1946).
4. *Davies, O. L., Raventos, I., Walpole, A. L.:* Brit. J. of Pharmacol. **1**, 225 (1946).
5. *Hougs-Ollson, W.:* Acta Pharm. et Tex. **5**, 33 (1949).
6. *Ercoli, N., Lewis, M. H.:* J. of Pharmacol **84**, 301 (1945).
7. *Pórszász, J., Herr, F.:* Kisérletes Orvostud. **2**, 295 (1950).
8. *Pórszász, J., Nyiri, M.:* Vortrag in der Fachgruppe »KOLAB« 1950.
9. *Herr, F., Pórszász, J.:* Arch. f. Exp. Path. u. Pharm. **210**, 294 (1950).
10. *Haffner, F.:* Dtsch. med. Wschr. **65**, 731 (1929).
11. *Wolfe, G., McDonald, A. D.:* J. of Pharmacol. and Exp. Ther. **80**, 300 (1944).
12. *Herr, F., Pórszász, J.:* Arch. f. Exp. Path. Pharm. **210**, 289 (1950)
13. *Scott, C. C., Chen, mK. K.:* J. of Pharmacol. and Exp. Ther. **87**, 63 (1946).
14. *Thorp, R. H., Walton, E., Offner, P.:* Nature **160**, 605 (1947).
15. *Tainter, M. L.*, cit. *Jonkmann, F. F.:* Annals of the New-York Academy of Sciences **51**, 59 (1948).
16. *Knoll, J., Komlós, E.:* Acta Physiol. Hung. **2**, 57, (1951).
17. *Goetzl, F. R., Burril, D. Y., Ivy, A. C.:* Bull. Northw. Univ. Med. School. **17** 280 (1946).
18. *Miller, L. C.:* Annals of The New-York Academy of Sciences **51**, 35 (1948).
19. *Myers, H. B.:* J. of Pharmacol. **6**, 601 (1914—15).
20. *Himmelsbach, C. K.:* J. of Pharmacol. **77**, 17 (1943).
21. *Faust, St. E.:* Arch. f. Exp. Pathol. u. Pharm. **44**, 217 (1900).
22. *Rübsamen, W.:* Arch. f. Exp. Pathol. u. Pharm. **59**, 227 (1908).
23. *Takayanagi, T.:* Arch. f. Exp. Pathol. u. Pharm. **102**, 176 (1924).

23a *Takayanagi, T.:* Arch. f. Exp. Pathol. u. Pharm. **102**, 183 (1924).

24. *Issekutz, B., Várady, A.:* Arch. f. Exp. Pathol. u. Pharm. **176**, 35 (1934).
25. *Zauder, H. L.:* J. of Pharmacol. a. Exp. Ther. **104**, 11 (1952).
26. *Keeser, E., Oelkers, H. A., Raetz, W.:* Arch. f. Exp. Path. **173**, 622 (1933).
27. *Pierce, I. H., Plant, O. H.:* J. of Pharmacol. a. Exp. Ther. **46**, 201 (1932).
28. *Schmidt, C. F., Livingstone, A. L.:* J. of Pharmacol. **47**, 443 (1933).
29. *Hatcher* und *Gold* cit. nach *Zander:* J. of Pharmacol. a. Exp. Ther. **104**, 11 (1952).
30. *Gross, E. G., Thompson, V.:* J. of Pharmacol. **68**, 413 (1940).
31. *Rickards, J. C., Boxer, G. E., Smith, C. F.:* J. of Pharmacol. **98**, 380 (1950).
32. *Way, E. L., Chen-Yü-Sung, McKelway, W. P.;* J. of Pharmacol. **97**, 222 (1940).
33. *Way, E. L.:* J. of Pharmacol. **96**, 477 (1949).
34. *Unna, K.:* J. of Pharmacol. **9**, 27 (1943).
35. *Hart, E. R., McCawley, E. I.:* J. of Pharmacol. **82**, 339 (1944).
36. *Wikler, A.:* Pharmacological Reviews **2**, 435 (1950).
37. *Huggins, R. A., Glass, W. G., Bryan, A. R.:* Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. **75**, 540 (1950).
38. *Huggins, R. A., Glass, W. G., Bryan, A. R.:* Proc. Soc. Biol. a. Med. **78**, 879 (1951).
39. *Schübel, K.:* Arch. f. Exp. Path. **88**, 1 (1920).
40. *Cloetta:* Arch. f. Exp. Path. **50**, 453 (1903).
41. *Gorovoj—Saltan, V. A.:* Фармакология и токсикология 6/VII. (1944).
42. *Zander, H. L.:* J. of Pharmacol. **101**, 40 (1951).

ИССЛЕДОВАНИЕ АНАЛГЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ И СКРЕЩЕННОЙ ПРИВЫЧКИ ПО ОТНОШЕНИЮ К БОЛЕУТОЛЯЮЩИМ СРЕДСТВАМ У КРЫС

И. Порсас, Л. Тардош, Ф. Херр. и М. Нири

Фармаколсгический институт медицинского университета, Будапешт

Резюме

1. Авторами был разработан метод для исследования действия болеутоляющих средств у крыс применением теплопроведения.

2. При помощи этсго метода авторы сравнивали болеутоляющее действие морфина, метадона, гексалгона и долантина. Определяя аналгетическое действие Мо в 1,—, то относительные величины метадона, гексалгона и долантина будут 2,39, 0,79, 0,36. Амидазофен имеет у крыс действие, которое прибл. 13 раз слабее действия морфина.

3. Метод авторов вполне удовлетворяет требования идеальной методики болеутоляющих средств.

4. При помощи своего метода авторы установили, что в отношении аналгетического действия морфина, метадона и гексалгона развивается скрещенная привычка, которая не состоится при амидазофене.

5. Скрещенная привычка развивается в отношении третьего болеутоляющего средства также и тогда, если это средство животному совсем не давали, и оно получало только два других средства.

6. Если в отношении одного болеутоляющего средства уже установилась привычка и дозировка продолжается другим средством до тех пор, пока не образовывается полная привычка и по отношению ко второму средству, то первое средство уже больше не приобретает обратно свое болеутоляющее действие.

7. Согласно достигнутым авторами результатам, можно заключить, что нельзя в течение продолжительного времени давать болеутоляющие средства, — даже и не попеременно, — без того, чтобы не развивалась бы привычка и не следовало бы увеличить дозу.

MESSUNG DER ANALGETISCHEN WIRKUNG

II. SPEZIFIZITÄT DER METHODE; LOKALISATION DER SCHMERZREAKTION BEDEUTENDEN BEWEGUNG IM ZENTRALNERVENSYSTEM

Von

F. HERR, L. TARDOS und J. PÓRSZÁSZ

PHARMAKOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen: am 30. Mai 1952)

In einer früheren Arbeit hatten wir die Kontaktwärmemethode zur Messung der Wirkung analgetischer Mittel beschrieben und damit die verschiedenen Analgetika verglichen (1, 2). Wir fanden, dass das Verfahren geeignet ist das gegenseitige Verhältnis der Wirkungsstärke der verschiedenen Analgetika darzustellen. Auch die Wirkung des Amidazophens konnten wir in dieser Weise entsprechend messen. In der vorliegenden Arbeit suchten wir folgende Fragen zu beantworten:

1. In welcher Weise wird die Schmerzreaktion durch die verschiedenen Pharmaka beeinflusst?

2. Welche ist die zentrale Lokalisation der bei unserer Methode angewandten Schmerzreaktion (Belecken der Pfote)?

3. Wie verhält sich unser Verfahren zu der am meisten benützten schmerzmessenden Methode von *D'Amour—Smith* (3).

Methodik. Wir führten unsere Versuche an 150—250 g schweren weissen Ratten und 18—24 g schweren weissen Mäusen aus. Die untersuchten Pharmaka wurden subkutan verabfolgt. Die Messung der analgetischen Wirkung erfolgte nach dem in unserer früheren Arbeit beschriebenen Verfahren. Die unter einem Glassturz auf eine auf 56° C, bzw. 53° C erwärmte Platte gelegten Ratten bzw. Mäuse belecken ihre Pfoten. Die bis zum Lecken der Pfote verflossene Zeit wurde 30 Minuten vor und nach Verabfolgung des Mittels gemessen. Ausserdem verwandten wir auch die Wärmestrahlungsmethode von *D'Amour—Smith* in der Weise, dass wir das mit Tusche schwarz gefärbte Ende des Rattenschwanzes mit Wärme bestrahlten und die bis zum Wegreissen des Schwanzes vergangene Zeit bestimmten. (Als Wärmequelle diente das mit einer Linse gesammelte Licht einer 500 W. Glühlampe). Bei der letztgenannten Methode betrug die Normalreaktionszeit bei 100 Ratten durchschnittlich 3,7 $\pm$ 1,1 sec. Bei der Auswertung der Ergebnisse bedienten wir uns auch bei dieser Methode desselben Berechnungsmodus, den wir in einer früheren Arbeit beschrieben hatten (2). Die Wirkung einer Einzeldose der Analgetika wurde an einer aus zehn Tieren bestehenden Gruppe gemessen, aber in der Mehrzahl der Fälle benutzten wir dazu zwei je zehn Tiere enthaltende Gruppen. Die Dekortisierung der Tiere wurde nach *Amslers*

TABELLE I

Wirkung verschiedener Pharmaka auf die Reaktionszeit der Ratten

Verbindung	Zahl der benützten Tiere	Dosis mg/kg	Zeitverlängerung in %	Bemerkung
Urethan	10	300	38	Schwach betäubt
	10	350	27	Schwach betäubt
	20	500	87	Betäubt
	20	700	100	Stark betäubt, 6 Ratten schlafen
Sevenal Na	20	50	—	
	10	70	20	Betäubt
	10	80	39	Betäubt, 3 Ratten schlafen
Paraldehyd	10	800	34	Schwach betäubt
	10	1000	25	Schwach betäubt
Aktedron	10	5	76	Stark aufgeregt
	10	10	75	Stark aufgeregt
	10	20	100	Stark aufgeregt
Coffein natr. benz.	20	50	18	Keinerlei motorische Erregung an den Ratten sichtbar
	20	100	18	
	20	125	31	
	20	150	47	
	20	200	59	
	20	300	75	
Strichnin nitr.	10	0,15	—	
	10	0,3	—	
	10	0,45	—	
Tetracor	10	20	28	Aufgeregt
	10	40	66	Stark aufgeregt
	10	70	100	Stark aufgeregt
Adrenalin	40	1	—	
Pilocarpin HCl	40	10	—	
	40	15	—	
Doryl	40	0,25	—	
Physostigmin sal.	40	0,1	—	
Prostigmin	40	0,1	—	
Histamin 2 HCl	20	100	—	
Pyribenzamin	20	5	—	
	20	30	50	Stark aufgeregt
Chinin HCl	10	60	—	
	10	120	—	

Verfahren ausgeführt (4) und die bei der Entfernung der Hirnrinde entstandene Blutung mit Thrombinpulver gestillt. Die dekortizierten Ratten benutzten wir 1 bis 8 Tage hindurch zu Versuchszwecken.

Ergebnisse

1. Der Einfluss verschiedener Pharmaka auf die Reaktionszeit ist in der I. Tabelle dargestellt. Daraus ist es ersichtlich, dass Strychnin, Adrenalin, Pilokarpin, Doryl, Physostigmin, Prostigmin, Histamin und Chinin in den untersuchten Dosen die Schmerzreaktionszeit überhaupt nicht beeinflussen. Eine Zeitverlängerung wird aber von den Narkotika und Exzitantia des Zentralnervensystems, sowie vom Pyribenzamin verursacht. Tief narkotisierende Dosen heben natürlich auch die Schmerzempfindung auf, aber mit unserer Methode erzeugen eine Verlängerung der Reaktionszeit selbst derart kleine Dosen, die mit anderen Verfahren noch gar keine Zeitverlängerung hervorrufen. Die Ursache dieser Erscheinung besteht darin, dass wir den Schmerz mit sehr schwachen Reizen erzeugen, und die oberflächliche Betäubung, welche die dargestellten Narkosen hervorrufen, ist dazu scheinbar ausreichend, dass die Tiere mit dem Belecken ihrer an der heissen Platte liegenden Pfoten aufhören.

Die Exzitantia des Zentralnervensystems: Aktedron, Tetracor, Koffein verursachen schon in relativ kleinen Dosen eine Verlängerung der Reaktionszeit. Wir beobachteten von 5 mg/kg Aktedron eine 76% ige, von ungefähr 13 mg/kg Morphin eine ebenso grosse Analgesie. Auf Grund der Analyse unserer Ergebnisse scheint also der Aktedron ein stärkeres Analgetikum zu sein, als das Morphin. Wenn wir aber Ratten, welche Morphin und Aktedron erhielten, miteinander vergleichen, so finden wir in ihrem Verhalten einen wesentlichen Unterschied. Während sich die mit Morphin behandelten Tiere verhältnismässig ruhig verhalten, sind die mit Aktedron behandelten äusserst aufgeregt und ihre Erregung an der heissen Platte nimmt nach einiger Zeit (15—25 sec.) noch zu: sie laufen unter dem Sturz im Kreis herum, suchen sich zu retten, benagen den Rand des Glases, lecken aber nicht ihre Pfoten. Auf Grund dieses Verhaltens dachten wir daran, dass das Ausbleiben des Pfotenleckens die Folge der Reizwirkung des Aktedrons auf das Zentralnervensystem sei. Wir versuchten die Reizwirkung mit Sevenal zu beseitigen; die Ergebnisse sind in der II. Tabelle dargestellt. Die erwähnten Versuche führten wir an Mäusen aus und fanden, dass 60 mg/kg Sevenal mit 7 mg/kg Aktedron zusammen verabreicht die Schmerzreaktionszeit verlängernde Wirkung des Aktedrons und die Aufregung der Tiere verhindert. Die Zeitverlängerung betrug nur 20% gegenüber eine durch das Aktedron allein erzeugte 63% ige Verlängerung; 60 mg/kg Sevenal ohne Aktedron hat keinen Einfluss auf die Reaktionszeit. Ähnliche Erfahrungen hatten wir auch bei Ratten.

TABELLE II

Wirkung von Aktedron und Aktedron + Sevenal auf die Maus

Zahl der Tiere	Dosis mg/kg		Analgesie in %	Bemerkung
	Aktedron	Sevenal		
40	5	—	0	
40	7	—	63	Aufgeregt
40	7	60	20	Ruhig
40	—	60	0	

TABELLE III

Wirkung von Koffein und Koffein + Sevenal auf die Maus

Zahl der Tiere	Dosis mg/kg		Analgesie in %
	Koffein	Sevenal	
40	150	—	21
40	200	—	48
40	250	—	52
40	300	—	61
40	250	40	26
40	300	40	22
20	—	40	0

An Tieren, die Koffein erhielten, beobachteten wir zwar keine motorische Erregung, untersuchten aber per analogiam der mit Aktedron ausgeführten Versuche, in welcher Weise das Sevenal die durch Koffein verursachte Verlängerung der Reaktionszeit beeinflusst. Die in der III. Tabelle mitgeteilten Versuche wurden an Mäusen unternommen. Wie ersichtlich, hatte 40 mg/kg Sevenal, mit 250 mg/kg Coffeinum natr. benzoicum gleichzeitig gegeben, die Reaktionszeit verlängernde Wirkung des Koffeins gehemmt, dagegen konnte festgestellt werden, dass 40 bzw. 60 mg/kg Sevenal weder die analgetische Wirkung des Morphins, noch die des Amidazophens beeinflusst hat.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die durch Exzitantia des Zentralnervensystems bewirkte Verlängerung der Reaktionszeit von der ähnlichen Wirkung des Morphins in mehrerer Hinsicht abweicht. Sevenal hemmt die durch die Erregungsmittel des Zentralnervensystems erzeugte Verlängerung der Reaktionszeit, beeinflusst aber nicht die Wirkung des Morphins und Amidazophens. Trotz dieser Differenzen kann nicht behauptet werden, dass die zentralen Erregungs-

mittel keine analgetische Wirkung hätten. Gerade die an Menschen ausgeführten Versuche beweisen den starken kortikalen Einfluss auf die Schmerzempfindung. [Eingebildete Schmerzen, Hemmungen (5, 6)]. *Nickerson* und *Goodman* haben die schmerzstillende Wirkung des Aktedrons durch verschiedene Verfahren erwiesen (7) und wir verwenden auch das Koffein in mannigfachen Kombinationen mit den nicht morphinartigen Analgetika. Einer von uns hatte in einer früheren Arbeit nachgewiesen, dass das Aktedron an spinalen Ratten auf die Reflexe geradezu gegensätzlich wirkt, wie das Morphin und seine Derivate. Durch Aktedron werden die Reflexe stimuliert, durch Morphin gehemmt (8). Demzufolge ist der Wirkungsmechanismus des Aktedrons bei der Schmerzstillung am Menschen ganz verschieden von den der im pharmakologischen Sinne genommenen Analgetika. Die Frage, ob das Sevenal der analgetischen Wirkung des Aktedrons entgegenarbeite, wird nur durch Menschenversuche definitiv entschieden werden können.

2. Nach Zusammenfassung der zur Messung der Analgesie dienenden Methoden stellt *Wikler* fest, dass das Verhältnis der in den Tierversuchen angewandten Schmerzreaktionen zur Schmerzempfindung noch eine offene Frage darstellt (9). *Houde* und seine Mitarbeiter (10) fanden bei ihren Untersuchungen mit dem *D'Amour—Smith*'schen Verfahren, dass Ratten mit durchtrenntem Rückenmark der normalen ähnliche Reaktion gaben, das Wegreissen des Schwanzes vor der strahlenden Wärme tritt also auch ohne Schmerzempfindung ein. *Herr, Nyiri, Venulet* (8) stellten mit der *D'Amour—Smith*'schen Methode fest, dass die normale Reaktionszeit an spinalen Ratten wesentlich kürzer ist, als bei normalen Tieren.

Bei unserer Methode sahen wir das Pfotenlecken als das Kriterium der Schmerzempfindung an. Diese Schmerzreaktion ist eine viel kompliziertere Bewegung, als alle anderen bisher verwandten Reaktionen (Wegreissen des Schwanzes, Quietschen, Hautzuckung, Rettungsversuche usw.). Durch die zentralen Erregungsmittel wird diese Abwehrbewegung erheblich gestört, demzufolge sind wir auf den Gedanken gekommen, dass der durch den Schmerzreiz ausgelöste Pfotenleckenreflex ganz oder wenigstens teilweise im Cortex lokalisiert ist. Zur Entscheidung dieser Frage prüften wir die durch die Kontaktwärme erzeugten, Schmerzreiz auslösenden Reaktionen.

Wir untersuchten an 46 dekortizierten Ratten, wie sie sich an der heissen Platte verhalten. Einige Sekunden (5—6 sec.) nach ihrem Auflegen auf die Platte wurden die Tiere sehr aufgeregt, suchten sich zu retten, liefen unter dem Glassturz im Kreis herum, aber die an den normalen Tieren beobachtete Schmerzreaktion, das Belecken der Pfote trat nicht auf. Bei einigen Ratten beobachteten wir das Nagen der Vorderbeine, dies erfolgte aber nur an dieser Stelle und nie an den Hinterbeinen und konnte vom Pfotenlecken gut unterschieden werden. Die normalen Ratten haben grösstenteils den hinteren Sohlenteil beleckt und zwar durchschnittlich 10 Sekunden nach ihrem Auflegen auf die Platte. Bei den

dekortizierten Ratten traten also die Abwehrbewegungen, die pseudo-Schmerzreflexe früher ein, als bei den normalen, aber das typische Pfotenlecken blieb weg. Bei der von *Wolfe—McDonald* mitgeteilten Kontaktwärmemethode, mit der sie die Wirkung der Analgetika untersuchten, besteht die Schmerzreaktion in der Unruhe der Maus und im Schütteln der Hinterbeine (11). Diese Bewegungen traten an den dekortizierten Ratten in derselben Weise oder noch ausgesprochener in Erscheinung, als an den normalen, demnach sind diese Reflexe, wie überhaupt sämtliche einfachere Abwehrreflexe, die als Schmerzreaktionen verwendet werden in den subkortikalen Gehirnteilen lokalisiert.

Die dekortizierten Ratten geben mit der *D'Amour—Smith*'schen Methode gemessen eine gute Schmerzreaktion und die Reaktionszeit zeigt als Zeichen der Befreiung von der kortikalen Hemmung den Normaltieren gegenüber eine erhebliche Verkürzung (8).

TABELLE IV

Vergleichung der analgetischen Morphinwirkung mit den zwei Verfahren

D'Amour—Smith Methode			Kontraktwärmemethode		
Zahl der Tiere	Morphin mg/kg sec.	Analgesie in %	Zahl der Tiere	Morphin mg/kg sec.	Analgesie in %
20	1	32	40	5	43
20	2	75	40	7,5	58
20	3	82	40	10	60
20	4	93	40	12,5	69
20	5	100	40	15	90
			20	17,5	100

3. Wir hatten unsere Methode an den selben Ratten mit der Methode von *D'Amour—Smith* verglichen. Die Wirkung der verschiedenen Morphingaben ist in der IV. Tabelle dargestellt. Hieraus ist zu ersehen, dass bei Untersuchung mit der *D'Amour—Smith* Methode schon 5 mg/kg eine 100%ige Analgesie erzeugt, während bei unserer Methode nur 17,5 mg/kg eine solche Wirkung auslöst. Hinsichtlich des Morphins ist also das Verfahren 3,5-mal empfindlicher, als unseres. Bezüglich der Morphinderivate (Heroin, Kodein, Methadon, Hexalgon und Dolantin) besteht auch die gleiche Differenz zwischen den zwei Verfahren. Bei den nicht morphinartigen analgetischen Mitteln ist wiederum unsere Methode

empfindlicher, weil das Amidazophen, dessen analgetische Wirkung mit dem Wärmestrahlungsverfahren nicht oder nur in toxischen Dosen nachweisbar ist, mit unserer Methode schon in verhältnismässig kleinen Dosen eine gut messbare (100 mg/kg sc.), 41%ige Wirkung erzeugt.

Zusammenfassung

Wir untersuchten mit unserer zur Messung der Analgesie ausgearbeiteten Methode die Wirkung verschiedener Pharmaka und fanden, dass die betäubenden Dosen der Narkotika und die zentralen Erregungsmittel die Reaktionszeit verlängern. Die Wirkung der letzteren kann mit geringen, an sich unwirksamen Sevenaldosen gehindert werden. Solche Sevenaldosen haben auf die Wirkung des Morphins oder des Amidazophens keinen Einfluss.

Wir untersuchten an Ratten die Reaktionen, welche durch den Schmerzreiz der Kontaktwärme ausgelöst werden und stellten fest, dass dekortizierte Ratten, die keine Schmerzempfindung haben können, auf eine 56° C heisse Platte gelegt, ihre Pfoten nicht belecken.

Wir verglichen unsere Methode mit der von *D'Amour—Smith* und fanden, dass die letztere bezüglich des Morphins und seiner Derivate 3,5-mal empfindlicher als die unsere, aber bezüglich der Wirkung vom nicht morphinartigen Amidazophen unsere Methode die empfindlichere ist.

LITERATUR

1. *Pórszász, J., Herr, F.:* Kísérletes Orvostud. **2**, 295 (1950).
2. *Pórszász, J., Tardos, L., Herr, F., Nyiri, M.:* Acta Physiol. Hung. **4**, 107 (1953).
3. *D'Amour, F. E., Smith, D.L .:* J. Pharmacol. **80**, 176 (1944).
4. *Amsler, C.:* Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **90**, 257 (1921).
5. *Psonik, A. T.:* Проблемы кортико-висцеральной патологии. Акад. Мед. Наук, Москва. 33 (1949).
6. *Szlivko:* zit. Kaminsskij, S. D. Проблемы кортико-висцеральной патологии. Акад. Мед. Наук., Москва. 104 (1949.)
7. *Nickerson, M., Goodman, L. S.:* Federation Proc. **6**, 360 (1947).
8. *Herr, F., Nyiri, M., Venulet, J.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 300 (1952)
9. *Wikler, A.:* Pharmacol. Reviews **2**, 435 (1950).
10. *Houde, R. W., Seevers, M. H., Purcell, E., Irwin, S.:* J. Pharmacol. **98**, 13 (1949).
11. *Wolfe, G., McDonald, A. D.:* ibidem **80**, 300 (1944).
12. *Houde, R. W., Wikler, A.:* zit. *Wikler, A.:* Pharmacol. Reviews **2**, 435 (1950)

ИЗМЕРЕНИЕ БОЛЕУТОЛЯЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ

II. Специфичность метода; локализация движения реакции боли центральной нервной системы

Ф. Херр, Л. Тардош и И. Порсас

Фармакологический институт медицинского университета, Будапешт

Резюме

Авторы исследовали действие различных фармаконов разработанным ими методом для измерения действия болеутоляющих средств и нашли, что одуряющие дозы снотворных средств и средства возбуждающие центральную нервную систему продлиняют время реакции. Действию этих средств можно препятствовать небольшой, само по себе недействующей, дозой севенала. Такая доза севенала не влияет на действие морфина, или амидазофена.

Авторы исследовали над подвергнутыми декортикации крысами реакции, возникающие вследствие раздражении боли, вызванной контактной теплотой и установили, что подвергнутая декортикации крыса (у которой не может быть чувство боли), в противоположность нормальной крысе, не лижет себе подошву, если ее кладут на подогретую в 56° C пластинку.

Авторы сравнивали их метод с методом Д'Амур-Смиса и нашли, что последний в отношении морфина и производных морфина в 3,5 раз чувствительнее, однако с точки зрения не морфинообразного действия амидазофена их метод является более чувствительным.

ÜBER DIE ROLLE DER EIWEISSBINDUNG IM SYNERGISMUS DER ANALGETIKA UND PARASYMPATHOMIMETIKA

Von

J. KNOLL, E. KOMLÓS und L. TARDOS

PHARMAKOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen: am 30. Juni 1952)

Nachdem wir in unseren früheren Versuchen festgestellt hatten, dass im Synergismus zwischen den analgetischen und parasympathomimetischen Mitteln dem Cholinergmechanismus keine wichtige Rolle zukommt, fanden wir, dass durch das Pepton alle diese Pharmaka gebunden werden. Diese Bindung, deren Mass wir mit der Verminderung der biologischen Wirkung bestimmten, konnten wir dadurch beeinflussen, dass zum Pepton-Analgetikum-Gemisch ein Parasympathomimetikum, beziehungsweise umgekehrt zum Pepton-Parasympathomimetikum-Gemisch ein Analgetikum zugesetzt wurde. Hierbei erhöhte sich nämlich die biologische Wirkung von neuem, als Zeichen dessen, dass durch das später zugesetzte Pharmakon das an das Pepton in unwirksamen Zustand gebundene Mittel verdrängt, d. h. dass die Bindungsfähigkeit des untersuchten Stoffes an das Pepton vermindert wurde (1). Zweck der vorliegenden Versuche war diese Verhältnisse mit Serumeiweissstoffen zu untersuchen.

Methodik

Wir führten unsere Schmerzstillungsversuche vom 15. IX. 1951 bis zum 15. I. 1952 an weissen Mäusen mittels der von *Pórszász—Herr* angegebenen Kontaktwärmemethode (2) unter denselben Bedingungen aus, die bereits in unseren früheren Mitteilungen wiederholt beschrieben worden sind. Dasselbe bezieht sich auch auf die Auswertung unserer Ergebnisse. Abweichungen unter 10%, die noch innerhalb der Fehlergrenze der Methodik liegen, wurden nicht berücksichtigt.

Wir verwandten bei unseren Versuchen stets menschliches Serum und untersuchten die Bindung des Serumeiweisses auf zweierlei Art. Einen Teil der Versuche führten wir auf die Weise aus, dass wir die analgetische Wirkung nach subkutaner Injektion der in Serum gelösten Pharmaka bestimmten. Die Lösungen wurden immer derart bereitet, dass die Mäuse auf je ein g Körpergewicht 0,01 ml Lösung erhielten.

In der Mehrzahl unserer Versuche bedienten wir uns aber zur Untersuchung der Bindung der Pharmaka an Serumeiweissstoffe der Dialysiermethode und

zwar in folgender Weise. Wir führten bei der Untersuchung eines jeden Analgetikums drei Dialysen aus. Der Durchmesser der zur Dialyse verwandten Cellophanhülsen betrug 1,5 cm in welche je 15 ml Flüssigkeit gebracht wurde. Die Dialyse führten wir immer bei Zimmertemperatur während 24 Stunden in der Weise aus, dass wir die Dialysierhülse in eine Hagedornröhre hängen liessen, welche eine dem inneren Flüssigkeitsgehalt der Hülsen gleiche Menge, d. h. 15 ml physiologische NaCl-Lösung enthielt. Die Analgetika wurden immer aus einer Stammlösung in die Hülsen derart eingemessen, dass alle drei Hülsen die gleiche Menge erhielten und zwar von Morphin und Methadon je 6 mg, von Dolantin 75 mg, von Hexalgon 15 mg, von Amidazophen 300 mg. Das Analgetikum wurde in der ersten Hülse immer in physiologische NaCl-Lösung, in der zweiten und dritten Hülse in Serum gelöst, in die dritte Hülse wurde ausserdem — ebenfalls aus einer Stammlösung eingemessen — 30 mg Cholinchlorid zugeführt. Der innere Flüssigkeitsgehalt der Hülsen betrug immer 15 ml. Da alle untersuchten Analgetika kleinmolekuläre Stoffe sind, musste der Gleichgewichtszustand, bezüglich ihres freien, nicht eiweissgebundenen Teiles, binnen 24 Stunden in der äusseren und inneren Flüssigkeit eintreten. Das Gleichgewicht konnte selbst dadurch nicht gestört werden, dass die innere Flüssigkeitsmenge in der zweiten und dritten Röhre infolge des osmotischen Druckes der Serumeiweissstoffe erhöht, die äussere dagegen vermindert wurde. Zur Untersuchung der analgetischen Wirkung verwandten wir immer die äussere Flüssigkeit.

Die Berechnung der in der Tabelle angegebenen Dosen ist aus dem folgenden Beispiel ersichtlich: Wir gaben z. B. von Morphin in jede Hülse 6 mg zu 15 ml Flüssigkeit; diese Menge wurde gegen weitere 15 ml Flüssigkeit dialysiert, so dass sich im Endergebnis diese 6 mg in 30 ml Flüssigkeit verteilten. Wir verwandten zu Untersuchungszwecken die äussere Flüssigkeit in der Weise, dass wir unter die Haut der Maus pro Grammgewicht 0,01 ml, d. h. 2γ/g, bzw. 2 mg/kg Morphin injizierten. In der ersten Dialysierröhre, wo das Analgetikum in physiologischem NaCl gelöst war, erhielten wir auch ein dieser Berechnung entsprechendes Resultat. Die von der Berechnung abweichenden Ergebnisse in der zweiten und dritten Röhre dürften die Folge der Eiweissbindung der Mittel gewesen sein; die Konzentration der freien Analgetikum-Moleküle soll nämlich in der äusseren und inneren Flüssigkeit, ohne Rücksicht auf ihre Menge, identisch sein. Die Verminderung der analgetischen Wirkung der äusseren Flüssigkeit ist also nur damit zu erklären, dass ein Teil des im Serum gelösten Analgetikums an die Eiweissstoffe gebunden war. Der Gleichgewichtszustand zwischen der äusseren und inneren Flüssigkeit stellt sich wiederum nur bezüglich der nicht gebundenen, frei dialysierenden Analgetikum-Moleküle ein. Demnach muss die Konzentration des Analgetikums in der äusseren Flüssigkeit natürlicherweise geringer sein, wenn das in der Dialysierhülse enthaltene Mittel in Serum und nicht in Wasser gelöst wurde.

Unsere Toxizitätsversuche führten wir in der Weise aus, dass wir den Untersuchungsstoff 10—10, bzw. 20—20 Mäusen subkutan in physiologischem NaCl gelöst auf Körpergewicht gerechnet derart verabfolgten, dass das Tier auf je 1 g 0,01 ml Flüssigkeit erhielt. Das Eingehen der Mäuse wurde in % en ausgedrückt.

Ergebnisse

Wir fassten unsere Ergebnisse in Tabellen zusammen.

TABELLE I

Wirkung der Lösung im Serum auf die analgetische Wirkung des Morphins und seiner Synergisten

Untersuchtes Analgetikum mg/kg	Synergisierendes Mittel mg/kg	Grad der Analgesie in % en			
		Zahl der Versuchstiere	In Wasser gelöst	Zahl der Versuchstiere	Im Serum gelöst
Morphin 5 mg/kg ...	—	60	134	60	58
Morphin 5 mg/kg ...	Prostigmin 0,1 mg/kg	60	275	60	91
Morphin 5 mg/kg ...	Cholin 200 mg/kg	60	210	60	106

Die erste Tabelle zeigt den Einfluss der Lösung im Serum auf die analgetische Wirkung des Morphins, der Morphin-Prostigmin-, bzw. Morphin-Cholin-Gemische. Es konnte festgestellt werden, dass das Serum die analgetische Wirkung des Morphins vermindert. Z. B. Morphin in 5 mg/kg Serum gelöst hat die gleiche analgetische Wirkung, wie dasselbe Mittel in 2 mg/kg gelöst. Prostigmin und Cholin im Serum gelöst steigern auch die analgetische Wirkung des Morphins. Die Wirkung von 5 mg/kg im Serum gelösten Morphin wurde durch 0,1 mg/kg Prostigmin, oder 200 mg/kg Cholin der Wirkung 2 mg/kg wassergelösten Morphins entsprechend erhöht. Dies kann auch so zustande kommen, dass die letzterwähnten Mittel einen Teil der gebundenen Morphinmoleküle vom Serumeiweiss verdrängen, wodurch die Zahl der zu den spezifischen schmerzstillenden Rezeptoren gelangenden Morphinmoleküle vermehrt und demnach die analgetische Wirkung erhöht wird. Es ist aber die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, dass die Wirkungssteigerung nicht durch diesen Mechanismus, sondern dadurch entsteht, dass die Parasympathomimetika die Wirkung der an Serumeiweiss nicht gebundenen, frei gebliebenen Analgetikum-Moleküle in irgend einer anderen Weise steigern.

TABELLE II

Die Rolle der Eiweissbindung des Pharmakons im Synergismus der Analgetika

Analgetikum mg/kg	Grad der Analgesie in % en ausgedrückt					
	Zahl der Versuchstiere	In Wasser gelöst und dialysiert	Zahl der Versuchstiere	Im Serum gelöst und dialysiert	Zahl der Versuchstiere	Im Serum gelöst mit Zusatz von 10 mg/kg Cholin und dialysiert
Morphin 2 mg/kg	60	54	45	24	45	47
Methadon 2 mg/kg	60	56	45	26	45	53
Dolantin 25 mg/kg	60	78	45	45	45	61
Hexalgon 5 mg/kg	60	44	45	23	45	34
Amidazophen 100 mg/kg ..	60	92	45	60	45	51

Zur Entscheidung dieser Frage führten wir unsere Dialysenversuche aus, deren Ergebnisse in der II. Tabelle dargestellt sind. Als synergisierendes Mittel wurde das Cholin gewählt und zwar in einer Dosis, die noch keine Wirkungssteigerung erzeugt. Das aufgelöste 30 mg Cholin verteilte sich nämlich in 30 ml Flüssigkeit, wovon wir den Mäusen je nach Grammgewicht 0,01 ml injiziert haben und auf dieser Weise maximal 10 gamma/g d. h. 10 mg/kg verabfolgen konnten. Andererseits hatten wir in einer früheren Arbeit nachgewiesen, dass die kleinste Cholingabe, welche die Wirkung der analgetischen Mittel synergisiert, 20 mg/kg beträgt. Aus diesen Ergebnissen ist es ersichtlich, dass das Serum die Wirkung sämtlicher Analgetika vermindert. Diese Verminderung der Wirkung wurde durch Cholin bei Verwendung von Morphin, Methadon und Dolantin erheblich, bei Hexalgon eben noch messbar gehemmt, während bei Amidazophen das Cholin unwirksam blieb. Da wir das Cholin in so geringer Menge verwandten, in der es noch keine synergisierende Wirkung ausüben konnte, dürfte die Ursache dieser Wirkungssteigerung darin liegen, dass das Cholin eine grosse Menge der an Eiweiss gebundenen Analgetika aus ihrer Bindung befreite, was in der Steigerung der analgetischen Wirkung in Erscheinung trat. Es muss bemerkt werden, dass die Menge des Cholins in der äusseren Flüssigkeit wesentlich geringer sein dürfte, als die berechnete Menge, da letztere auf Grund gleichmässiger Verteilung bestimmt wurde. Ein Teil des Cholins wird aber ebenfalls vom Eiweiss gebunden, demzufolge die Zahl der freien Cholinmoleküle in der äusseren Flüssigkeit, bzw. die Konzentration in der äusseren und inneren Flüssigkeit geringer sein muss, als die vorher theoretisch berechnete Menge. Bezüglich des Amidazophens ist die Lage die folgende : Da dieses Pharmakon im Verhältnis zum Cholin

in sehr grosser Molekülenzahl verwandt werden musste, ist unsere Methodik zum Nachweis der analgetischen Wirkung der durch das Cholin herabgesetzten kleinen Zahl der Amidazophen-Moleküle nicht genügend empfindlich.

Bezüglich des Hexalgons möchten wir bemerken, dass dieses Pharmakon immer sehr schwach synergisiert werden konnte und der Synergismus erhebliche jahreszeitliche Schwankungen zeigte.

Um die Eiweissbindung der parasympathikomimetischen Mittel unmittelbar nachzuweisen, führten wir Versuche mit Prostigmin aus. Die gleiche Menge Prostigmin wurde in Wasser, bzw. in Serum gelöst und unter den selben Bedingungen, wie oben beschrieben, dialysiert. Die Untersuchung des Grades der Eiweissbindung erfolgte mit der äusseren Flüssigkeit in der Weise, dass ihre toxische Wirkung an weissen Mäusen bewertet wurde. Unsere Ergebnisse sind in der III. Tabelle enthalten, woraus zu ersehen ist, dass das Prostigmin vom Serum stark gebunden wird.

TABELLE III

Die Rolle der Eiweissbindung des Pharmakons in der Toxizität von 0,5 mg/kg Prostigmin

In Wasser gelöst und dialysiert			In Serum gelöst und dialysiert		
Zahl der Versuchstiere	Eingegangene Tiere		Zahl der Versuchstiere	Eingegangene Tiere	
	Zahl	%		Zahl	%
20	16	80	20	9	45

Nachdem wir die Tatsache bewiesen hatten, dass die Analgetika und Parasympathomimetika an die Serumeiweissstoffe gebunden werden, blieb die Frage noch offen, ob solche Mittel, die sich fest und dauernd mit dem Eiweiss verbinden, und demzufolge seine Bindungsfähigkeit herabsetzen können, imstande wären die Wirkung der verschiedenen an Eiweiss gebundenen Pharmaka zu steigern. Eine ganze Reihe solcher Stoffe sind aus dem Schrifttum bekannt. So besitzen besonders das Germanin (4—5) und die verschiedenen Farbstoffe diese Eigenschaft. *N. Jancsó* und *J. Gábor A.* hatten nachgewiesen, dass mit Hilfe des wenig toxischen Germanins in vivo verschiedene Stoffe aus ihrer Plasmabindung verdrängt werden können, womit sie den ersten Beweis erbrachten, dass auf diesem Wege die Verteilung mehrerer Stoffe im Organismus geändert werden kann. In den gegenwärtigen Versuchen untersuchten wir den Einfluss des Germanins auf die Wirkung der Analgetika und Parasympathomimetika.

Vor allem mussten wir uns davon überzeugen, ob das Germanin nicht selbst eine analgetische Fähigkeit besitze. Mit unserer Methodik konnten wir aber an 40 Tieren selbst mit 30 mg/kg keine Verlängerung der Reaktionszeit erzielen ; Germanin allein besitzt also keine analgetische Wirkung.

Der Einfluss des Germanins auf die schmerzstillende Wirkung der Analgetika ist in der IV. Tabelle dargestellt. Daraus ist zu ersehen, dass Germanin

die Wirkung der von uns untersuchten Analgetika, mit Ausnahme des Hexalgons zu steigern vermag. Es ist interessant, dass das Verdrängen des Hexalgons vom Serumeiweiss in unseren Dialyseversuchen ebenfalls nur schwach gelang. Die Ursache ist entweder in der starken Bindung des Hexalgons an das Serumeiweiss zu suchen, oder darin, dass diese Bindung spezifisch ist, woraus das Pharmakon nur durch gewisse, bestimmte Gruppen enthaltende Verbindungen in nachweisbarem Masse befreit werden kann.

TABELLE IV

Einfluss von Germanin auf die schmerzstillende Wirkung der Analgetika

Analgetikum mg/kg	Grad der Analgesie in % en			
	Zahl der Versuchstiere	Allein	Zahl der Versuchstiere	mit 200 mg/kg Germanin verabfolgt
Morphin 1 mg/kg	60	22	40	63
Methadon 2 mg/kg	60	40	40	64
Dolantin 15 mg/kg	60	47	40	64
Amidazophen 50 mg/kg	60	19	40	55
Hexalgon 6 mg/kg	60	75	40	76

TABELLE V

Wirkung von Germanin auf die Toxicität der Parasympathomimetika

Parasympathomimetikum mg/kg	Eingegangene Tiere			Mit 200 mg/kg Germanin verabfolgt		
	Zahl der Versuchstiere	Zahl	%	Zahl der Versuchstiere	Zahl	%
Prostigmin 0,3 mg/kg	10	1	10	10	4	40
Physostigmin 0,7 mg/kg	10	1	10	10	5	50

Die V. Tabelle zeigt, dass Germanin die Toxizität von Prostigmin und Physostigmin erhöht.

Besprechung der Ergebnisse

Unsere Versuche zeigen, dass das Serumeiweiss alle jene von uns untersuchte Pharmaka bindet, zwischen denen ein Synergismus besteht und dass die Bindung eines Pharmakons an das Serumeiweiss durch Zugabe eines anderen vermindert werden kann.

Schon in unseren früheren Versuchen, in denen wir den Wirkungsmechanismus des Synergismus zwischen Analgetika und Parasympathomimetika zu erforschen suchten, beobachteten wir solche wiedersprechende Tatsachen, welche mit der bis dorthin vertretenen Auffassung der cholinergischen Wirkungsweise in keinen Einklang gebracht werden konnten ; so ist es mit dieser Auffassung unvereinbar, dass die das Morphin synergisierende toxische Wirkung des Prostigmins durch Atropin kaum vermindert (7), die analgetische Wirkung sogar erhöht wird (8). Nicht zu vereinbaren mit der cholinerg-Theorie ist die Tatsache, dass das anti-cholinerg Mittel Atropin selbst analgetisch wirkt (8) ferner, dass die zwischen den Analgetika und Parasympathomimetika beobachtete Wirkungssteigerung davon unabhängig ist, in welchem Masse diese Mittel den vegetativen Tonus beeinflussen. So wird die Wirkung der Analgetika durch das in dieser Beziehung kaum wirksame Cholin schon in kleiner Dosis stark synergisiert, während die stark cholinergisch wirkende T.E.P.P. nicht einmal in DL_{50} über diese Wirkung verfügt (9, 10). Wir hatten schliesslich nachgewiesen, dass auch das Mass der Hemmung der Cholinesterase-Aktivität des Gehirns in keinem kausalen Zusammenhang mit den erwähnten Synergismen steht (11).

Auf Grund dieser früheren, aber vor allem unseren mit Pepton und Serum ausgeführten Untersuchungen sind wir der Meinung, dass die Synergismen hauptsächlich durch den folgenden Mechanismus entstehen dürften.

Die Moleküle der Pharmaka verteilen sich im Organismus an den verschiedenen Rezeptoren in der Weise, dass nur der eine Teil der Moleküle zu jenen Rezeptoren gelangt, an denen sie ihre spezifische pharmakologische Wirkung entfalten. Der andere, vermutlich entscheidend grössere Teil, beteiligt sich an anderen, bezüglich der Wirkung unbedeutenden Bindungen. Diese »verloren gegangene« Moleküle werden teils an die Organe, teils an die Serumeiweissstoffe gebunden.

Wenn wir also beispielsweise die analgetische Wirkung irgendeiner Morphindosis an Mäusen untersuchen, so gelangt nur ein Bruchteil der verabfolgten Menge zu den entsprechenden Rezeptoren des Zentralnervensystems, wo er seine Wirkung ausübt (12), die überwiegende Mehrzahl der Morphinmoleküle geht aber — hinsichtlich der Wirkung — in anderen Bindungen, unter anderen auch an den Serumeiweissstoffen verloren. Dasselbe bezieht sich auch auf alle übrigen untersuchten Pharmaka. Werden nun zwei Pharmaka z. B. Cholin und Morphin kombiniert, so erfahren wir, dass Cholin die schmerzstillende Wirkung des Morphins erhöht, obwohl es selbst keine analgetische Wirkung

besitzt (9). Gleichzeitig beobachteten wir in Modellversuchen, dass das Cholin die Bindung des Morphins an der Oberfläche des Serumeiweisses oder Peptons vermindern kann (1). Nach Analyse unserer Ergebnisse stellen wir uns also den Synergismus auf Grund unserer Experimente so vor, dass das Cholin in vivo die Verteilung des Morphins innerhalb des Organismus verändert und zwar dadurch, dass die Bindungsstellen des Morphins und Cholins teilweise (z. B. in den Serumeiweissstoffen) übereinstimmen. Demnach kommt in Gegenwart von Cholin weniger Morphin in die — bezüglich der Wirkung irrelevante — Bindung und es gelangen mehr Moleküle zu jenen Rezeptoren, wo das Morphin seine spezifische pharmakologische Wirkung entfaltet. Derselbe Mechanismus besteht — mit Ausnahme des Hexalgons, zwischen den von uns untersuchten Analgetika und Parasymphatomimetika und erklärt den beobachteten Synergismus.

Unseres Erachtens handelt es sich also im Falle der erwähnten Kombinationen darum, dass wir bei gleichzeitiger Verabfolgung zweier, mit einander synergisierenden Mittel die Bindungsfähigkeit des Eiweisses für beide Mittel verändern — und zwar vermindern — und die Zahl der freien Moleküle, die zu jenen Rezeptoren gelangen können, wo sie die primäre Wirkung entfalten, vermehren.

Aus diesen Tatsachen folgt auch eine weitere, und zwar, dass bei diesen Synergismen die Menge des an den spezifischen Rezeptoren befindlichen Pharmakons zunehmen muss. Dass dem tatsächlich so ist, hat man für die Barbiturate erwiesen (13). Bekanntlich wird die Wirkung der Barbiturate durch Parasympathomimetika gesteigert (14, 15). *Greig* und *Mayberry* hatten nachgewiesen, dass die Menge des im Gehirn befindlichen Barbiturates auf Physostigminwirkung zunimmt (13). Diese Tatsache brachten die erwähnten Autoren damit in Zusammenhang, dass das Physostigmin die Permeabilität der Blut-Liquor Barrière erhöht. Der Umstand aber, dass nur Physostigmin eine solche permeabilitätssteigernde Fähigkeit besitzt, der Synergismus aber auch mit anderen Parasympathomimetika erzeugt werden kann, lässt die Folgerung zu, dass die Permeabilitätssteigerung in diesen Synergismen keine grosse Bedeutung haben kann. Auch andere Überlegungen sprechen dagegen, dass im Entstehen des Synergismus zwischen Analgetika und Parasympathomimetika die Änderung der Permeabilität eine grosse Rolle spielen würde. Betrachten wir eine von uns früher mitgeteilte Abbildung (7) bezüglich des zwischen Morphin und Prostigmin hinsichtlich der Toxicität bestehenden Synergismus, so können wir sehen, dass die Toxicität des Prostigmins schon durch die Wirkung einiger Mikrogrammen Morphin ausserordentlich stark erhöht wird. Dessen Ursache kann aber nicht in der Permeabilitätssteigerung der Blut-Liquor Barrière liegen.

Die Germaninversuche liefern weitere Beweise für unsere Feststellung, d. h. dass die entscheidende Rolle im Synergismus der Analgetika und Parasympathomimetika dem obigen Mechanismus zuzuschreiben ist. Dieser Syner-

gismus muss nämlich in seiner Gänze auf dem Mechanismus beruhen, dass das Germanin diese Pharmaka aus ihren Eiweissbindungen verdrängt und die Bindungsfähigkeit der Eiweissstoffe ihnen gegenüber vermindert. Demzufolge nimmt die Zahl der freien Moleküle des untersuchten Stoffe zu, welche zu jenen Rezeptoren gelangen, wo sie ihre spezifische pharmakologische Wirkung entfalten. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass wir die Wirkung der verschiedenen Pharmaka innerhalb des Organismus auf die erwünschte Weise beeinflussen können, wenn wir die Möglichkeit ihrer Bindung verändern. Die Bindung an die Serumeiweissstoffe und natürlich auch die viel weniger bekannte Bindung an die Organeiweisse und deren Beeinflussung zeigen uns den Weg, auf dem die Synergisierung und Antagonisierung der Pharmaka möglich ist.

Zusammenfassung

1. Wir untersuchten den Einfluss des menschlichen Serum auf die schmerzstillende Wirkung verschiedener Analgetika (Morphin, Methadon, Dolantin, Hexalgon, Amidazophen). Die Lösung im Serum vermindert die analgetische Wirkung des Morphins, sowie der Morphin-Prostigmin Gemische.

2. Unsere Dialysenversuche zeigen, dass sämtliche untersuchten Analgetika durch Menschenserum gebunden werden.

3. Ebenfalls mit Dialysenversuchen haben wir bewiesen, dass das Cholin bereits in einer derart kleinen Dosis, die keine synergistische Wirkung entfaltet, die Bindung der Analgetika an das Serum — mit Ausnahme von Hexalgon und Amidazophen — nachweisbar vermindert.

4. Prostigmin wird auch von Menschenserum gebunden.

5. Germanin (Bayer 205) steigert die analgetische Wirkung von Morphin, Methadon, Dolantin und Amidazophen und die Toxicität des Physostigmins und Prostigmins an weissen Mäusen.

LITERATUR

1. *Knoll, J., Komlós, E.:* Acta Physiol. Hung. **3** 127 (1952).
2. *Pórszász, J., Herr, F.:* Kisérletes Orvostudomány **2**, 295 (1950).
3. *Jancsó, N., Gábor, A. J.:* Acta Physiol. Hung. Suppl. **1**, 3 (1951).
4. *Dewey, H. M., Wormall, A.:* Bioch. J. **40**, 119 (1946).
5. *Spinks, A.:* ibidem **42**, 109 (1948).
6. *Goldstein, A.:* J. of Pharm. and Exp. Ther. Pharm. Reviews **95**, II. 102 (1949).
7. *Komlós, E., Pórszász, J., Knoll, J.:* Acta Physiol. Hung. **1**. 77 (1950).
8. *Knoll, J., Komlós, E.:* ibidem **2**, 57 (1951).
9. *Pórszász, J., Knoll, J., Komlós, E.:* ibidem **2**, 469 (1951).
10. *Komlós, E., Knoll, J.:* ibidem **3**, 123 (1952).
11. *Knoll, J., Komlós, E., Pórszász, J.:* ibidem **2**, 479 (1951).
12. *Heger:* Rev. Internat. de Therapeut. et Pharm. Bruxelles, sept. 1894.
13. *Marquis, Ed.:* Arbeiten aus dem Pharmakol. Institut Dorpat. **11**, 117. (18^6)
14. *Greig, M. E., Mayberry, Th. C.:* J. of Pharm. and Exp. Ther. **1**, 10?, (1951).
15. *Frommel, E., Favre, M., Valette, F.:* Helv. Med. Acta **15**, 134 (1948).
16. *Frommel, E., Bischler, A., Gold, P., Favre, M., Valette, F.:* Helv. Phys. Acta **5**, 64 (1947).

О РОЛИ БЕЛКОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ В СИНЕРГИЗМЕ БОЛЕУТОЛЯЮЩИХ СРЕДСТВ И ПАРАСИМПАТОМИМЕТИКОВ

И. Кнолл, Е. Комлош и Л. Тардош
Фармакологический институт медицинского университета, Будапешт

Резюме

1. Авторами было исследовано влияние человеческой сыворотки на болеутоляющее действие различных болеутоляющих средств (морфин, метадон, долантин, гексалгон, амидазофен). Раствор в сыворотке уменьшает болеутоляющее действие морфина, равно как и смесей морфин-простигмина.

2. Опыты диализа показали, что все болеутоляющие средства связываются с человеческой сывороткой.

3. Опыты диализа показали также, что холин, данный даже в маленьких дозах, не вызывающих синергистического действия, доказанным образом уменьшает связывание болеутоляющих средств к сыворотке – за исключением гексалгона и амидазофена.

4. Простигмин также связывается человеческой сывороткой.

5. Германин (Байер 205) повышает болеутоляющее действие морфина, метадона, долантина и амидазофена, а также и токсичность физостигмина и простигмина на белых мышах.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PHARMAKOLOGISCHE WIRKUNG DER QUATERNÄRTROPEINE UND DER TEA-ARTIGEN GANGLION-BLOCKIERENDEN SUBSTANZEN

Von

J. PÓRSZÁSZ und L. GYÖRGY

PHARMAKOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST.

(Eingegangen: am 12. August 1952)

Die Ganglion (Ggl) lähmende Wirkung des Tetraaethylammonium-ions wurde von *Burn* und *Dale* (1) entdeckt und diese Wirkung auch bei anderen Trimethylalkyl-ammonium Verbindungen festgestellt (2, 3, 4). Da die Ggl-lähmende Wirkung des TEA verhältnissmässig schwach und kurzdauernd ist, hat man, besonders in den letzten Jahren Verbindungen solcher Wirkung in grosser Zahl hergestellt. Die Bis-trimethyl-ammoniumsalze des Penta-, Hexa- und Heptamethonium's (5, 6) erwiesen sich viel stärker als das TEA. Nach den Untersuchungen von *Gyermek* (7, 8, 9) besitzen die Quaternärtropeine und deren Derivate eine hochaktive Ggl-lähmende Wirkung. Von dieser Erkenntnis ausgehend stellten *Nádor* und seine Mitarbeiter (10, 11, 12) eine ganze Reihe Quaternärtropein-Derivate her, die nach den Untersuchungen von *Gyermek* (9) und *Issekutz* (13) viel stärker wirken, als das TEA.

Die durch das TEA erzeugte Blutdrucksenkung wurde schon von zahlreichen Autoren analisiert und festgestellt, dass sie durch die Lähmung der Symphaticus-ggl. verursacht wird. Ausser der Ggl-lähmenden Wirkung verfügt das TEA noch über mehrere andere pharmakologische Eigenschaften. So lähmt es nach einzelnen Verfassern das Aminooxydase (14), mehrfach wiederholte Injektionen üben eine pressorische Wirkung aus (15). Am Menschen erhöht schon die erste Injektion den Blutdruck, z. B. nach Apoplexie (15). Aus der Leber und Nebenniere mobilisiert das TEA Sympathin (15) und es wurde auch über seine vasokonstriktorische Wirkung berichtet (16).

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Frage, ob zwischen den Quaternärtropeinen und den TEA-artigen Ggl-blockierenden Substanzen ausser der Stärke der Ggl-lähmenden Wirkung auch andere nachweisbare pharmakologische Differenzen bestehen.

Methodik

Wir führten unsere Versuche an 45, 2,5—5,0 kg schweren Katzen in Urethan-Narkose aus. Der Blutdruck wurde in der rechten a. carotis mittels Quecksilbermanometer gemessen. Die Verbindungen verabfolgten wir auf Körpergewichts-

kilogramm gerechnet, in Mengen von 0,5—1,0 ml in 0,9% NaCl gelöst in die rechte Vena femoralis. Das Adrenalin infundierten wir mittels eines motorbetriebenen Infusionsapparates in die linke Vena femoralis in der Menge von 12 und 24 γ/kg, pro Minute in 1 ml. Die Tiere wurden durch diese Adrenalin-Infusionen nicht einmal nach über vier-fünffach wiederholten, 15—20 Minuten dauernder Anwendung geschädigt und es trat auch kein Lungenödem auf. Infusion von 12 γ/kg/min. Adrenalin erhöhte den Blutdruck um durchschnittlich 54 mm Hg; 24 γ/kg/min. um durchschnittlich 71 mm Hg. Die Sympathicus Ggl-lähmende Wirkung wurde mit der durch die elektrische Kondensator-Entladungsreizung entstandene Verminderung der Kontraktionen gemessen. Atropin verabfolgten wir in 1 mg/kg Menge i. v. stündlich einmal, mit Rücksicht darauf, dass die überwiegende Mehrzahl unserer Versuche 2—5 Stunden dauerten. Die Lähmung der Vagus-Ggl. wurde auf zweierlei Art geprüft. Zum Teil reizten wir den linken Halsvagus mit einem Strom gleicher Frequenz und Stärke, wie den Sympathicusnerven und bestimmten die der Reizung folgende Abnahme der Pulsfrequenz, die im Verhältnis zur ursprünglichen Frequenz in Prozenten ausgedrückt wurde. Andererseits untersuchten wir die Lähmung durch Verwendung der mit der Adrenalin-Infusion ausgelösten reflektorischen Steigerung des Vagustonus. Unserer Meinung nach ist die auf die zweite Art ausgelöste Vagusreizung bedeutend physiologischer, als die durch faradischen Strom erzeugte.

Versuche

A) *Beeinflussung der durch Adrenalin ausgelösten Steigerung des Vagustonus mit N-239 (p-Brombenzyl-dl-mandelyltropinium bromid)* und TEA (Tetra aethylammonium bromid).

In der Abbildung 1 ist die vasodepressorische Wirkung von 40, beziehungsweise 80 γ/kg N-239 *(1, 2)*, sowie 3 und 1 mg/kg TEA sichtbar *(3, 4)*; der Blutdruck sinkt und die durch Reizung des Halssympathicus ausgelösten Kontraktionen der Nickhaut werden geringer. Wir gaben nur nach völligem Aufhören der auf diese Art gemessenen Ggl-lähmenden Wirkung eine weitere Ggl-lähmende Dosis. Beim Zeichen 5 begannen wir mit einer Adrenalin-Infusion von 12 γ/kg/min., wodurch der Blutdruck um 50 mm Hg erhöht wurde. Das nachher in der dritten Minute verabfolgte 40 γ/kg N-239 *(1)* (s. Abb.) setzte den Blutdruck nicht herab, sondern erhöhte ihn plötzlich um 50 mm Hg, beseitigte auch die bisher bestehende Bradykardie und es trat eine ausgeprochene Tachykardie auf. Die durch das N-239 erzeugte Blutdrucksteigerung lief in fünf Minuten ab und das nach dieser Zeit injizierte 3 mg/kg TEA (Zeichen *3*) erwirkte statt der Blutdrucksenkung auch hier eine Steigerung um beiläufig 54 mm Hg. Auch in diesem Falle trat eine ausgesprochene Tachykardie auf. Aus der Abbildung ist es klar ersichtlich, dass sich die Nickhaut während der

Adrenalin-Infusion in dauernder Kontraktion befindet, nach dem Aufhören der Infusion aber sofort erschlafft (Zeichen 5/a) und auch der Blutdruck sinkt unter den normalen Wert.

B) *Einfluss der Atropinisierung auf die pressorische Wirkung des während der Adrenalin-Infusion verabfolgten N-239 und TEA.*

Wenn die während der Adrenalin-Infusion verabfolgten Ggl-lähmenden Substanzen den Blutdruck deshalb erhöhen, weil sie die Hemmwirkung des

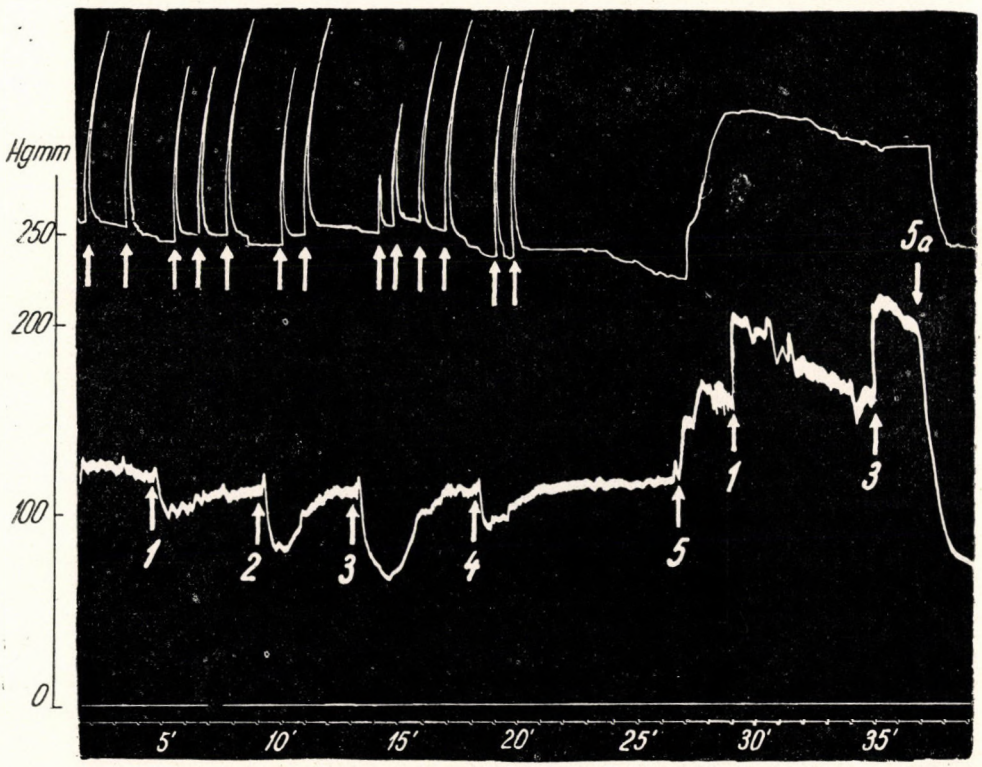


Abb. 1. Beeinflussung der durch Adrenalin ausgelöste Steigerung des Vagustonus mit N-239 und TEA
3,0 Kg schwere Katze. Urethannarkose. — Zeichen von oben nach unten: Nickhaut, Blutdruck, 0 Linie und Zeitmarke. — 1. 40 γ/kg N-239. — 2. 80 γ/kg N-239. — 3. mg/kg TEA. — 4. 1 mg/kg TEA. — 5. Beginn der 12 γ/kg/min. Adrenalin-Infusion. — 5/a Ende der Infusion

Vagus auf das Herz aufheben und auch andere gefässerweiternde Ggl. ausschalten, so dürfte die ganze Erscheinung am atropinisierten Tier nicht zustande kommen. Einen solchen Versuch stellt Abb. 2 dar. Beim Zeichen *1* beginnt die Adrenalin-Infusion mit 12 γ/kg/min., die den Blutdruck um beiläufig 120 mm Hg hob und die sofortige Kontraktion der Nickhaut bewirkte. Durch das nun gegebene 80 und 400 γ/kg N-239 (Zeichen *2*, *3*) wird der Blutdruck

überhaupt nicht geändert. Ebenfalls blieb auch das 3 mg/kg TEA ohne Wirkung (Zeichen 4). Nur 1,2 mg/kg N-239 (Zeichen 5) setzte den Blutdruck um 30 mm Hg herab. Eine solche Dosis N-239 ohne Adrenalin-Infusion senkte den Blutdruck um mindestens 100 mm Hg. 10 mg/kg TEA (Zeichen 6) verhält sich aber völlig gegensätzlich als das N-239. Diese Dosis hob den Blutdruck wieder um cca 20 mm Hg und kontrahierte gleichzeitig die Nickhaut.

C. Einfluss der doppelseitigen Vagotomie auf die während der Adrenalin-Infusion auftretende pressorische Wirkung von N-239 und TEA.

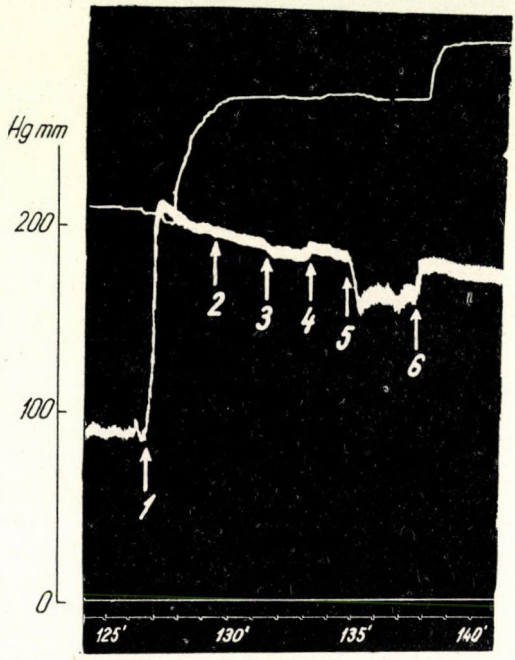


Abb. 2. Einfluss der Atropinisierung auf die pressorische Wirkung von während der Adrenalin-Infusion verabfolgten N-239 und TEA
3,0 kg schwere Katze. Urethannarkose. Stündlich 1 mg/kg Atropin. — Zeichen von oben nach unten: Nickhaut, Blutdruck, 0 Linie und Zeitmarke. — 1. Beginn der 12 γ/kg/min. Adrenalin-Infusion. — 2. 80γk/g N-239. — 3. 400 γ/kg N-239. — 4. 3 mg/kg TEA. — 5. 1,2 mgk/g N-239. — 6. 10 mg/kg TEA

Da Atropin die durch das Adrenalin ausgelöste Steigerung des Vagustonus im ganzen Körper aufhebt, untersuchten wir die Frage, ob nur die doppelseitige Durchtrennung des Halsvagus dieselben Wirkungen erzeugen könne, als das Atropin. Damit versuchten wir die Rolle anderer parasympathischer Nerven in dem durch die Blutdrucksteigerung erzeugten Kompensationsmechanismus zu differenzieren. Man hatte nämlich beschrieben, dass es solche vasodilatatorische Fasern gibt, die das Rückenmark

über die hinteren Wurzeln verlassen. Hätte also die Lähmung deren eine wesentliche Rolle in der pressorischen Wirkung des N- 239 und TEA während der Adrenalin-Infusion gespielt, so dürften sich die Ergebnisse nach der Vagotomie von den an normalen Tieren während der Adrenalin-Infusion gewonnenen

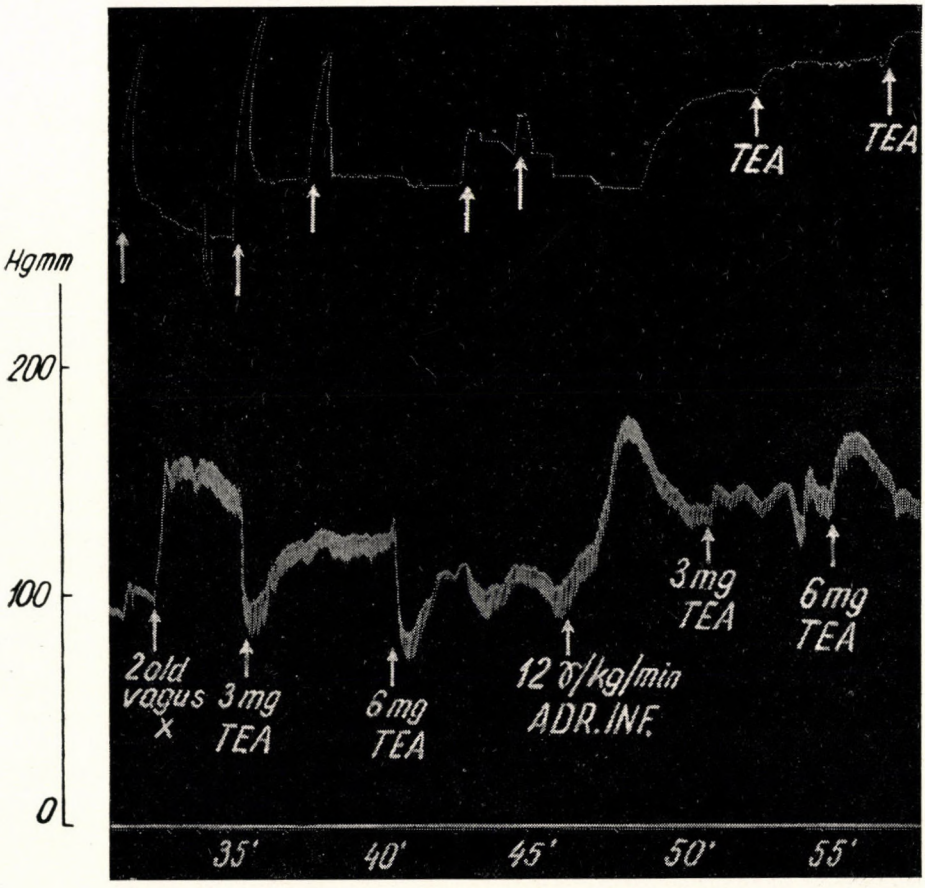


Abb. 3. Einfluss der doppelseitigen Vagotomie auf die pressorische Wirkung der während der Adrenalin-Infusion verabfolgten TEA
3,2 kg schwere Katze. Urethannarkose. — Zeichen von oben nach unten: Nickhaut, Blutdruck, 0 Linie und Zeitmarke

Resultaten nicht unterscheiden. Abbildung 3 zeigt einen bezeichnenden Versuch. Hier ist zu sehen, dass die doppelseitige Vagotomie die blutdruckherabsetzende Wirkung von 3 und 6 mg/kg TEA nicht beeinflusst. Während der Adreinalin-Infusion wirkt aber TEA auch am vagotomierten Tier pressorisch, wenn auch nicht so intensiv, wie an Tieren mit intaktem Vagus. Das N- 239 erzeugt unter solchen Umständen während der Adrenal-Ininfusion

keine Blutdrucksteigerung, lässt im Gegensatz zum TEA den Druck entweder unverändert oder setzt ihn erst in grosser Dosis herab. Die Grösse der Senkung ist also auch hier viel geringer während der Adrenalin-Infusion, als ohne diese am normalen Tier. Die Versuchsergebnisse zeigen also eine grosse Ähnlichkeit mit den an atropinbehandelten Tieren gewonnenen Resultaten. Man kann davon sagen, dass während der Adrenalin-Infusion die Ggl.-lähmende Substanzen nur infolge Ausschaltung der Vagus-ggl. den Blutdruck steigern und andere parasympathische Fasern im Kompensationsmechanismus keine Rolle spielen.

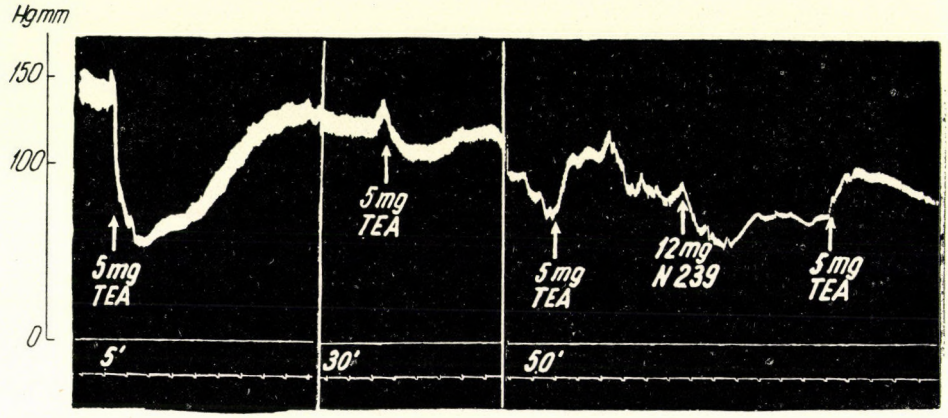


Abb. 4. Wirkung des mehrfach nacheinander verabfolgten TEA auf den Blutdruck 3,6 kg schwere Katze. Urethannarkose. — Zeichen von oben nach unten: Blutdruck, 0 Linie und Zeitmarke. — Zwischen der 14 und 29-ten Minute zweimal, und zwischen der 36 und 49-ten Minute dreimal wiederholte Verabfolgung von 5 mg/kg TEA

Nach *Acheson* (17) verlieren die mehrfach nach einander verabfolgten kleinen TEA-Dosen (1—2 mg/kg) nicht ihre vasopressorische Wirkung. Wenn aber zwischen die kleinen Dosen auch eine grössere (30 mg/kg) eingeschaltet wird, so erhöhen nachher selbst die kleinen Dosen den Blutdruck. Die zuerst verabfolgten grossen Dosen (10—100 mg/kg) erhöhen aber in der Mehrzahl der Fälle auch ohne eine anfängliche Senkung den Blutdruck.

Page (15) hatte auch an Hunden und Katzen bewiesen, dass nach wiederholter Verabfolgung von TEA, die depressorische Wirkung ausbleibt und ohne anfängliche Senkung eine Blutdrucksteigerung entsteht. Da die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen war, dass das TEA am atropinisierten, bzw. vagotomisierten Tier während der Adrenalin-Infusion deshalb eine pressorische Wirkung gewann, weil das Tier vorher auch TEA erhielt, machten wir auch diese Frage zum Gegenstand unserer Untersuchung.

D. Wirkung vom mehrfach nach einander verabfolgten N- 239 und TEA auf den Blutdruck.

Auch in unseren Versuchen verlor das in 5 mg/kg Menge intravenös eingespritzte TEA gewöhnlich bereits nach der viermal, oder fünfmal wiederholten Verabfolgung seine depressorische Wirkung und veränderte den Blutdruck entweder überhaupt nicht, oder erhöhte ihn um 20—40 mm Hg. Dagegen behielt das N-239, auch beliebig wiederholt, seine depressorische Wirkung. Es ist interessant, dass sogar in den Fällen, in welchen das TEA den Blutdruck nicht verändert, oder schon pressorisch wirkt (Abb. 4), das N-239 noch immer eine Blutdrucksenkung hervorruft. Wir prüften die Frage, ob die Wirkung des TEA pressorisch verwandelt werden könnte, wenn wir die Tiere zuerst nicht mit TEA

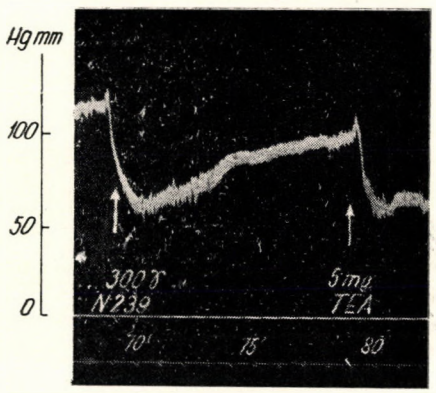


Abb. 5. Wirkung der mehrfach nacheinander wiederholten Verabfolgung von N 239 auf den Blutdruck

2,6 kg schwere Katze. Urethannarkose. — Zeichen von oben nach unten: Blutdruck, 0 Linie und Zeitmarke. — Vorher wurde neunmal 300 gamma/kg N 239 injiziert

Injektionen, sondern mit N-239 behandeln. Abbildung 5 zeigt einen solchen Versuch, wo nach der zehnten Gabe von 300 γ/kg N-239 5 mg/kg TEA noch immer depressorisch wirkte. Das TEA wirkt also erst dann pressorisch, wenn das Tier vorher mehrmals TEA erhielt. Wenn aber das TEA den Blutdruck nicht mehr herabsetzt, sondern erhöht, so kann diese Wirkung durch eine zwischengeschaltete grosse Dosis N-239 nicht verhindert werden. (s. Abb. 4).

Nach unseren Versuchen wird aber das TEA am atropinisierten oder vagotomisierten Tier während der Adrenalin-Infusion auch dann pressorisch wirken, wenn es kein enziges mal TEA erhalten hat. Das vorher verabfolgte N-239 spielte also in unseren Versuchen gar keine Rolle in der pressorischen Umwandlung des TEA und das vorher gegebene TEA kann auch nicht die ausschliessliche Ursache der umgekehrten Wirkung sein. Wir kommen auf die Erklärung dieser Erscheinung später noch zurück.

E. Veränderungen der Nickhaut (Membrana nictitans).

Während der Adrenalin-Infusion ist die Nickhaut dauernd kontrahiert und zwar verursachte eine 12 γ/kg/min. Adrenalin-Infusion eine Kontraktion von durchschnittlich 28 mm, die Infusion von 24 γ/kg/min. eine von 42 mm. (Übertragung von 1 : 20.) Der Tonus der kontrahierten Nickhaut wird durch 0,02—1,6 mg/kg N-239 nicht beeinflusst, durch extrem grosse Dosen (5—10 mg/kg) aber schon erheblich herabgesetzt. Andererseits erzeugt das TEA eine weitere erhebliche Kontraktion der durch das Adrenalin kontrahierten Nickhaut. An der Abb. 3 sind diese Folgen auf die Wirkung von 3 und 6 mg/kg TEA, an Abb. 2 nach 10 mg/kg und an Abb. 6 nach 6 und 10 mg/kg TEA gut sichtbar. Diese Erscheinung war in beiläufig 80% der Fälle zu beobachten. Nach unseren Erfahrungen wird der Tonus der Nickhaut ohne Adrenalin-

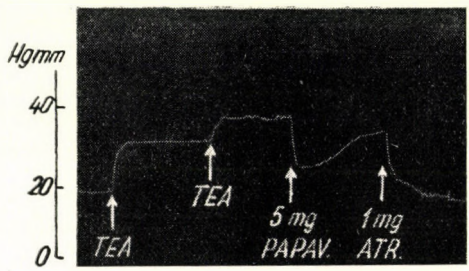


Abb. 6. Veränderung der Nickhaut

4,0 kg schwere Katze. Urethannarkose. — 12 γ/kg/min. Adrenalin-Infusion. — 6 und 10 mg/kg TEA, 5 mg/kg Papaverin, 1 mg/kg Atropin

Infusion durch die Ggl.-lähmenden Substanzen bei den von uns verwendeten Dosen überhaupt nicht beeinflusst. Hinsichtlich des TEA wurde dies auch von anderen Autoren bestätigt (18). Atropin (in 1 mg/kg Dosis) erschlafft erheblich die durch die Adrenalin-Infusion kontrahierte Nickhaut (Abb. 6). Wir prüften auch die Wirkung von Papaverin in 1, 2, 5 und 8 mg/kg Dosen. An der Abb. 6 ist es sichtbar, dass 5 mg/kg Papaverin den Krampf der Nickhaut vorübergehend gelöst, aber 1 mg/kg Atropin eine stärkere Erschlaffung verursacht hat. Mit dem Mechanismus dieser Erscheinung werden wir uns später noch beschäftigen. Soviel können wir aber schon jetzt feststellen, dass diese Wirkung von den Ggl.-lähmenden Eigenschaften der Verbindungen unabhängig ist, Atropin ist nämlich eine unvergleichlich schwächere Ggl.-lähmende Substanz, als N-239. Papaverin verfügt über keine Ggl.-lähmende Wirkung und das TEA ruft statt der spasmolytischen Wirkung eine weitere Kontraktion der Nickhaut hervor.

F) Untersuchung der Lähmung parasympathischer Ganglien mit elektrischer Reizung des Vagus

Wir untersuchten die Wirkung von 300 gamma/kg N-239 und 3 mg/kg TEA auf die durch Vagusreizung ausgelöste Bradykardie mit Verwendung eines so starken Reizes, der eine cca. 20—25%-ige Abnahme der Pulszahl verursachte. Nach Einspritzung des TEA trat eine durchschnittlich 54%-ige Frequenzsteigerung auf und der Blutdruck sank um 64 mm Hg. Gleichzeitig mit der Senkung erzeugte die Vagusreizung schon keine Bradykardie. Die Vagus-ggl.-lähmende Wirkung dauerte cca. 6—8 Minuten. Ähnliche Resultate gewannen wir auf die Wirkung von 300 gamma/kg N-239.

G) Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Wir stellten unsere an 45 Katzen gewonnenen Resultate bezüglich des N-239 in der I., bezüglich des TEA in der II. Tabelle zusammen. Beide Tabellen haben dieselbe Einteilung. In der Spalte »A« sind die Ergebnisse an Tieren mit intaktem parasympathischen Nervensystem, in der Spalte »B« die an doppelseitig vagotomierten, in der Spalte »C« die an atropinisierten und in der Säule »D« die an vagotomierten und zugleich atropinisierten Tieren gewonnenen Resultate dargestellt. In allen vier Spalten befinden sich drei Unterteilungen z. B. A_1, A_2, A_3, welche die ohne, bzw. mit 12 und 24 γ/kg/min. Adrenalin-Infusion gewonnenen Ergebnisse enthalten. Die in der Tabelle befindlichen Zahlen stellen die Durchschnittswerte der Blutdruckänderungen in mm Hg dar. Die negativen Vorzeichen bedeuten die Senkung, die positiven die Steigerung des Blutdruckes, die kleinen Zahlen ohne Vorzeichen die Zahl der auf die entsprechende Dosis bezüglichen Versuche.

1. *Zusammenfassung der mit N-239 gewonnenen Ergebnisse* (Tab. I)

Aus der Tabelle ist es ersichtlich, dass N-239 an den »normalen Kontrolltieren« mit intaktem parasympathischem Nervensystem (A_1) in einer 0,02—0,40 mg/kg Dosis eine Blutdrucksenkung von 28—76 mm Hg hervorruft. Während der Adrenalin-Infusion (12 und 24 γ/kg/min.) erhöht das N-239 den Blutdruck (A_2, A_3). Wir fanden keinen Unterschied in der Grössenordnung der Blutdrucksteigerung bei den zweierlei Adrenalin-Infusionen.

Vagotomie ohne Adrenalin-Infusion beeinflusst nicht die vasodepressorische Wirkung des N-239 (B_1). Die gewonnenen Senkungszahlen entsprechen auch in der Grössenordnung den Werten der Kontrollgruppe (A_1), aber N-239 nach Vagotomie während der Adrenalin-Infusion, in verschiedenen Dosen gegeben, hat keine Blutdrucksteigerung, sondern Blutdrucksenkung erzeugt. (B_2, B_3.) Die Tabelle zeigt aber auch, dass die Blutdrucksenkung erheblich geringer ist, als ohne der Adrenalin-Infusion. Während z. B. 0,04 mg/kg N-239

TABELLE I

Zusammenfassung der mit N-239 gewonnenen Ergebnisse. (Erklärung s. im Text)

Dosis mg/kg	Normale Kontrollen			Nach doppelseitiger Vagotomie			Nach Atropinisierung 1 mg/kg/Stunde			Nach doppelseitiger Vagotomie und Atropinisierung			
	Adrenalin Infusion γ/kg/min.												
	—	12	24	—	12	24	—	12	24	—	12	24	
0,02	—28	+23	+34			—28		0					
	6	2	2			1		1					Zahl der Versuche
0,04	—46	+25	+21	—50	—11	—24	—40	0		—24	— 8	—10	
	13	7	15	2	5	3	4	4		1	3	1	Zahl der Versuche
0,08	—38	+25	+ 3	—60	—17	— 3	—51	—16	—15	—17	— 3	— 3	
	5	6	2	1	2	4	2	4	4	1	3	6	Zahl der Versuche
0,15	—40	+ 7	+26	—36	— 8		—28	— 1					
	2	1	2	1	2		1	4					Zahl der Versuche
0,3	—76				— 4	—12		0				—18	
	4				4	1		1				1	Zahl der Versuche
0,4	—59			—44	— 9	—15		—10	—14	—44	—12	— 9	
	2			1	2	2		3	1	1	6	7	Zahl der Versuche
0,5											—12		
											2		Zahl der Versuche
0,8											— 6	—13	
											1	3	Zahl der Versuche
1,2						—10		—33		—10	—12	—12	
						1		3		1	4	1	Zahl der Versuche
1,6								— 22			—23	—17	
								1			2	6	Zahl der Versuche
5,0											—56		
											4		Zahl der Versuche
10,0											—40		
											1		Zahl der Versuche
	A_1	A_2	A_3	B_1	B_2	B_3	C_1	C_2	C_3	D_1	D_2	D_3	
	A			B			C			D			

den Blutdruck an normalen Tieren um 46 mm Hg, an vagotomierten um 50 mm Hg herabsetzt, ruft 12 γ/kg/min. an vagotomisierten Tieren während der Adrenalin-Infusion nur eine Senkung von 11 mm Hg hervor. Die an atropinisierten Tieren gewonnenen Ergebnisse sind in der C Rubrik der Tabelle dargestellt. Es ist zu beobachten, dass Atropinisierung an sich die durch verschiedene Dosen von N-239 verursachten Senkungen nicht beeinflusst (C_1). Diese entsprechen auch in der Grössenordnung den Werten der Rubriken A_1 und B_1. Ähnlich den nur doppelseitig vagotomisierten Tieren, kommt an solchen Tieren auch während der Adrenalin-Infusion keine Blutdrucksteigerung zustande, es bedarf sogar viel grösserer Dosen (C_2, C_3) um gleich grosse Senkungen zu erzeugen, als an Normaltieren eine Dosis von 0,02—0,15 mg/kg verursacht (A_1). Bei Adrenalin-Infusionen nach doppelseitiger Vagotomie und gleichzeitiger Atropinisierung unterscheiden sich die Ergebnisse nicht von den Werten der Rubriken B und C.

2. *Zusammenfassung der mit dem TEA gewonnenen Ergebnisse* (Tab. II)

Aus der Tabelle ist es ersichtlich, dass an normalen Tieren zwischen den TEA Dosen von 0,5—10,0 mg/kg im Grade der blutdruckherabsetzenden Wirkung kein Unterschied besteht (A_1). Auf Wirkung der Adrenalin-Infusion verwandelt sich die Blutdrucksenkung auch hier in Blutdrucksteigerung. Diese Ergebnisse stimmen also mit denen des N-239 überein. Vagotomie, ebenso wie N-239 hat keinen Einfluss auf die depressorische Wirkung des TEA (B_1). Dagegen bewährt das TEA während Adrenalin-Infusion am vagotomisierten Tier noch immer seine blutdrucksteigernde Fähigkeit (B_2, B_3.). Auch nach Atropinisierung erhöht das TEA während Adrenalin-Infusion den Blutdruck in Gegensatz zu dem unter den gleichen Verhältnissen gegebenen N-239 (C_2, C_3.). Atropin ohne Adrenalin-Infusion übt keinen Einfluss auf die depressorische Wirkung des TEA aus (C_1). Nach doppelseitiger Vagotomie und gleichzeitiger Atropinisierung unterscheiden sich die Resultate qualitativ nicht (D_1, D_2, D_3) von denen der Gruppen B und C.

Obwohl wir Versuche mit Hexamethonium nur in geringerer Zahl ausführten, ist es doch anzunehmen dass sich dieses Mittel scheinbar ähnlich wie das TEA verhält, es ruft nähmlich während Adrenalin-Infusion am vagotomisierten Tier keine Blutdrucksenkung, sondern eher eine Blutdrucksteigerung hervor, wenn auch in geringerem Grade, als das TEA.

Besprechung der Ergebnisse

Aus unseren Versuchen geht es eindeutig hervor, dass die untersuchten Ggl.-lähmenden Substanzen während der Adrenalin-Infusion den Blutdruck nicht wie üblich herabsetzen, sondern im Gegenteil erhöhen. Unserer Meinung nach kann dies zwei Ursachen haben. Einerseits könnte es angenommen

TABELLE II

Zusammenfassung der mit TEA gewonnenen Ergebnisse. (Erklärung s. im Text)

Dosis mg/kg	Normale Kontrollen			Nach doppelseitiger Vagotomie			Nach Atropinisierung 1mg/kg/Stunde			Nach doppelseitiger Vagotomie und Atropinisierung			
	Adrenalin Infusion γ/kg/min.												
	—	12	24	—	12	24	—	12	24	—	12	24	
0,5	—45	+19	+11										Zahl der Versuche
	4	4	3										
1	—39	+ 6	+38				—39	+ 8					Zahl der Versuche
	7	4	4				3	1					
2	—49	+23		—41	+12		—40	+ 9	+14			+15	Zahl der Versuche
	8	3		2	1		5	3	1			2	
3	—45	+37	+24	—45	+20	+10	—55	+ 5	+22	—20	+10	+16	Zahl der Versuche
	11	6	4	4	6	1	3	4	2	1	4	6	
4	—67	+ 4		—52	+20	+36	—63	+26	+13	— 7	+14		Zahl der Versuche
	2	1		2	1	1	2	2	1	2	2		
5	—78	+16			+19	+20		+14					Zahl der Versuche
	5	1			3	1		2					
6	—59		+22	—49	+18	+18		+23	+27	— 7	+10	+19	Zahl der Versuche
	4		1	3	9	1		3	1	2	4	7	
10	—56				+26	+14		+22			+14	+17	Zahl der Versuche
	1				4	1		4			3	3	
20											+12	+22	Zahl der Versuche
											1	1	
40											+48		Zahl der Versuche
											2		
	A_1	A_2	A_3	B_1	B_2	B_3	C_1	C_2	C_3	D_1	D_2	D_3	
	A			B			C			D			

werden, dass die Ggl.-lähmenden Substanzen gegen Adrenalin, entweder unmittelbar, oder wie es *Page* meint, durch Lähmung der Aminooxydase sensibilisieren (14). Anderseits wäre es möglich, dass sie während der Adrenalin-Infusion den Blutdruck deshalb erhöhen, weil sie die parasympathischen Ganglien lähmen. Untersuchen wir nun die Frage, in welcher Weise unsere Ergebnisse mit diesen zwei Annahmen erklärt werden können. Mit der Theorie der Sensibilisierung gegen Adrenalin kann man die blutdrucksteigernde Wirkung des TEA gut begründen, um so eher, da es während der Adrenalin-Infusion die schon kontrahierte Nickhaut gleichzeitig mit der Blutdrucksteigerung noch mehr kontrahiert, obwohl es unter normalen Verhältnissen diese Fähigkeit nicht besitzt. Diese Theorie ist aber zur Erklärung des Verhaltens des N-239 ungeeignet. Diese Verbindung verursacht nämlich während der Adrenalin-Infusion nur an normalen Tieren eine Blutdrucksteigerung, dagegen entfaltet sie unter ähnlichen Verhältnissen an vagotomisierten und atropinisierten Tieren, im Gegensatz zum TEA, eine depressorische Wirkung. Würde diese Verbindung ähnlich dem TEA durch Sensibilisierung der Nervenendigungen eine Blutdrucksteigerung erzeugen, so müsste diese Erscheinung auch nach Ausschaltung, oder Lähmung des parasympathischen Nervensystems weiter bestehen. Unseres Erachtens ist also die pressorische Wirkung des N-239 während der Adrenalin-Infusion nur mit der Ausschaltung der parasympathischen Ggl. zu erklären. Im Falle vom TEA dürften beide Faktoren eine Rolle haben. Dass N-239 den Organismus gegen Adrenalin nicht sensibilisiert, wird auch damit bewiesen, dass es die während der Adrenalin-Infusion kontrahierte Nickhaut nicht beeinflusst. Die Möglichkeit, dass die Ausschaltung des parasympathischen Nervensystems während der Adrenalin-Infusion eine Blutdrucksteigerung hervorrufen kann, können wir auch damit beweisen, dass in unseren Versuchen 10—20 γ/kg Atropin unter solchen Verhältnissen auch pressorisch wirkt und die Nickhaut nicht beeinflusst. Eine grosse Dosis (1 mg/kg) Atropin ruft aber auch während der Adrenalin-Infusion eine starke Blutdrucksenkung ohne anfängliche Steigerung hervor.

In unseren Versuchen dauerte die Wirkung der Ganglion-lähmenden Substanzen je nach den angewandten Dosen 4—12 Minuten. In einigen Versuchen verabfolgten wir die Ggl.-lähmenden Substanzen binnen dieser Zeit, unmittelbar nach einander während der Adrenalin-Infusion. In solchen Fällen machten wir die folgende Erfahrung. Wenn die Wirkung des vorher verabfolgten Ggl.-lähmenden Mittels (TEA, N-239) noch andauert, dann erzeugte das nachher gegebene N-239 bereits keine Erhöhung des Blutdrucks, die drucksteigernde Wirkung des TEA wurde geringer. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass nach vorheriger Ausschaltung des parasympathischen Nervensystems (mit Atropinisierung, Vagotomie, Ggl.-lähmenden Substanzen) das N-239 während der Adrenalin-Infusion bereits keine Blutdrucksteigerung hervorzurufen vermag. Diese Versuche liefern demnach einen klaren Beweis dafür, dass die Ggl.-lähmenden Substanzen eine

sehr ausgesprochene Hemmwirkung auf die parasympathischen Ggl. ausüben und die Blutdrucksteigerung während der Adrenalin-Infusion von N-239 nur auf diesem Wege, vom TEA aber noch durch irgend einen anderen Mechanismus (Adrenalinmobilisation) erzeugt wird. Die unmittelbare Wirkung der Ggl.-lähmenden Substanzen auf die Vagusggl. haben wir in Übereinstimmung mit den Literaturdaten in unseren, mittels elektrischer Reizung des Vagus ausgeführten Versuchen erwiesen.

Unsere Ergebnisse scheinen mit den Untersuchungen von *Moe* und Mitarbeiter (19) in Gegensatz zu sein. Dieser Autor war nämlich nicht imstande während der Adrenalin-Infusion mit TEA eine Blutdrucksteigerung auszulösen, es blieb nur dessen depressorische Wirkung aus. Hieraus zog er die Folgerung, dass in der Gegenregulation der auf die Adrenalinwirkung erfolgten Blutdrucksteigerung eine vermehrte vasodilatorische Aktivität keine Rolle spielen kann, sondern eine wichtigere Rolle der reflektorischen Hemmung des Vasokonstriktor-Apparates zuzuschreiben wäre. Unserer Meinung nach dürfte die von *Moe* angewandte Adrenalin-Infusion (0,8—1,2 γ/kg/min.) ungenügend gewesen sein. Dagegen konnten wir mit der 10—20-fachen Dosis eine erhebliche Steigerung des Vagustonus auslösen, wofür auch die starke Bradykardie sprach. Auch wir führten Versuche mit kleineren Adrenalin-Infusionen (0,6 γ/kg/min.) an atropinisierten Tieren aus und fanden, dass im Gegensatz zu den grösseren Adrenalin-Infusionen der Grad der Blutdrucksenkung kaum etwas geringer war, als an normalen Tieren ohne Adrenalin-Infusion.

Hinsichtlich der blutdrucksteigernden Wirkung des N-239 während der Adrenalin-Infusion ist ausser den obenerwähnten noch anzunehmen, dass deren Ursache in der aus seiner Konstruktion sich ergebenden atropinartigen Wirkung des N-239 liegen dürfte. Nach den Untersuchungen von *Gyermek* (9) ist die parasympathische Wirkung dieser Verbindung am isolierten Kaninchendarm 80-mal schwächer, als die des Atropins. Nach unseren Untersuchungen erzeugt aber eine solche Dosis Atropin bereits keine Blutdrucksteigerung während der Adrenalin-Infusion.

Es ist die Möglichkeit zu erwägen, dass das TEA während der Adrenalin-Infusion den Blutdruck deshalb erhöhe, weil es eine unmittelbare vasokonstriktorische Wirkung besitzt (16). Die von uns angewandten TEA-Dosen von 0,5—10,0 mg/kg erzeugten unter normalen Verhältnissen nie eine Blutdrucksteigerung. Die Untersuchungen von *Acheson* (17) zeigen auch, dass die vasokonstriktorische Wirkung des TEA an normalen Tieren nur bei 10,0—100,0 mg/kg Dosen zur Geltung kommt.

Die blutdrucksteigernde Wirkung der Ggl.-lähmenden Substanzen während der Adrenalin-Infusion ist im Falle von N-239 hauptsächlich, im Falle von TEA teilweise mit der Befreiung des Herzens von der Hemmwirkung des Vagus zu erklären. Beim N-239 wird nämlich die während der Infusion auftretende Blut-

drucksteigerung bereits durch die Vagotomie aufgehoben. Im übrigen führten wir bezüglich der Herzwirkung des N-239 orientierende Versuche an isolierten Froschherzen aus und fanden, dass eine 0,1—2,0 mg/ml N-239 enthaltende Ringer-Lösung eine positiv inotrope Wirkung auf das Herz ausübt, es konnte also nicht vorausgesetzt werden, dass an vagotomierten Tieren die während der Adrenalin-Infusion verabfolgten grössere Dosen von N-239 den Blutdruck durch die Schwächung des Herzens herabsetzen.

Unsere Versuche liefern einen schönen Beweis dafür, dass die depressorische Wirkung des N-239 am atropinisierten Tier während Adrenalin-Infusion bedeutend geringer ist, als am normalen Tier ohne Adrenalin-Infusion. Da Atropin die blutdrucksenkende Wirkung des N-239 nicht beeinflusst, ist es interessant, warum wir in solchen Fällen eine geringere Blutdrucksenkung erhalten. Es ist schwer anzunehmen, dass das Atropin die durch N-239 erzeugte Blutdrucksenkung nur in Gegenwart von Adrenalin hemmen könnte. *Bernthal* (20) hat es nachgewiesen, dass durch eine extensive Sympathektomie die vasomotorischen Reflexe des Sinus caroticus völlig ausgeschaltet werden. Demzufolge ist die Änderung der Aktivität des vasomotorischen Apparates als ein wichtiger Mechanismus in der Regelung des Blutdruckes anzusehen. Man nimmt im allgemeinen an, dass der Vasomotor-Tonus durch die Blutdrucksteigerung reflektorisch gehemmt wird (19). Wenn aber der Vasomotor-Tonus schon infolge der durch das Adrenalin verursachten Blutdrucksteigerung gehemmt ist, dann wird natürlich auch die durch die Ggl.-lähmenden Substanzen erzeugte Blutdrucksenkung entweder völlig ausbleiben, oder viel geringer werden. Wir erblicken in der durch Adrenalin bewirkten reflektorischen Hemmung des Vasomotor-Tonus die Ursache dessen, dass das über das Adrenalin wirkende N-239 den Blutdruck während der Adrenalin-Infusion am atropinisierten oder vagotomisierten Tier weniger herabgesetzt hat. Diese Auffassung scheint unsere mit dem TEA ausgeführten Untersuchungen zu unterstützen. Wir hatten erwiesen, dass die wiederholten TEA-Dosen ihre vasopressorische Wirkung verlieren und sich in Pressoren verwandeln. Die Ursache der pressorischen Wirkung des TEA wurde von *Page* (15) entdeckt, der festgestellt hat, dass es unmittelbar aus der Leber und in geringem Mass aus den Nebennieren Sympathin, bzw. Adrenalin mobilisiert. Am normalen Tier erlangt das TEA nur nach wiederholter Anwendung eine pressorische Wirkung. Dagegen erhöht während der Adrenalin-Infusion (wenn die Steigerung des Vagustonus in der Gegenregulation durch Atropin oder Vagotomie ausgeschaltet wurde) schon die erste TEA-Dosis sofort den Blutdruck. Diese Erscheinung kann man damit erklären, dass infolge der durch das Adrenalin ausgelösten Blutdrucksteigerung der Vasokonstriktor-Tonus reflektorisch gelähmt wird, somit kann ihn das TEA nicht mehr lähmen und daher kommt seine Sympathin mobilisierende Wirkung rein zur Geltung. Überdies hat es den Anschein, dass in dieser Blutdrucksteigerung — wie schon erwähnt — auch die Sensibilisierung gegen Adrenalin eine Rolle spielen dürfte.

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass sich das N-239 und wahrscheinlich auch die übrigen Quaternärtropeine von dem TEA nicht nur in der Stärke der Ggl.-lähmenden Wirkung unterscheiden. Diese erlangen im Gegensatz zum TEA auch nach mehrfach wiederholter Anwendung keine vasopressorische Wirkung, sie mobilisieren nicht Sympathin aus der Leber und Nebenniere und sensibilisieren nicht die Organe gegen Adrenalin, wirken also viel elektiver auf die vegetativen Ggl. als das TEA.

Zusammenfassung

1. An normalen Tieren bringen N-239 und TEA eine beträchtliche Blutdrucksenkung hervor, das mit Atropinisierung und Vagotomie nicht beeinflusst werden kann.

2. N-239 und TEA erhöhen den Blutdruck wesentlich während der Adrenalin-Infusion.

3. An vagotomisierten Tieren bleibt während der Adrenalin-Infusion die blutdrucksteigernde Wirkung des N-239 aus, grössere, die originale übersteigende Dosen erzeugen aber wieder eine Blutdrucksenkung.

4. An vagotomisierten Tieren erhöht aber das TEA während der Adrenalin-Infusion im Gegensatz zum N-239 den Blutdruck in geringerem Masse, als an Tieren mit intaktem Vagus.

5. Am atropinisierten Tier beeinflusst N-239 in der Originaldosis während der Adrenalin-Infusion den Blutdruck nicht, setzt ihn aber in grösserer Dosis wieder herab. TEA erzeugt aber auch in diesem Fall eine weitere Blutdrucksteigerung.

6. N-239 setzt den Blutdruck an vagotomisierten und atropinisierten Tieren während der Adrenalin-Infusion herab, dagegen ist die blutdrucksteigernde Wirkung des TEA auch hier zu beobachten.

7. Während der Adrenalin-Infusion zieht sich die Nickhaut zusammen, worauf N-239 in einer Dosis von 0,02—1,6 mg/kg wirkungslos ist, dagegen erzeugt TEA in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle eine weitere Kontraktion der Nickhaut. Atropin in 1 mg/kg Dosis erschlafft wesentlich die kontrahierte Nickhaut. Grosse Dosen von N-239 (5,0 mg/kg) entfalten die gleiche Wirkung. Papaverin in 5 mg/kg Dosis verursacht eine geringere und kürzer dauernde Tonusverminderung, als 1 mg/kg Atropin. Nach unserer Ansicht ist die Tonusverminderung unabhängig von der Ggl.-lähmenden Wirkung der Verbindungen.

8. N-239 übt im Gegensatz zum TEA auch nach mehrfach wiederholten Dosen keine vasopressorische Wirkung aus. Unseres Erachtens wirken die Quaternärtropeine nicht nur stärker, sondern auch elektiver auf die vegetativen Ggl., als das TEA.

9. Zusammenfassend können wir feststellen, dass während die bisherigen Untersuchungsmethoden am Normaltier nur eine quantitative Differenz zwischen den zwei Ggl.-lähmenden Mitteln nachzuweisen vermochten, ist an den während der Adrenalin-Infusion atropinisierten, bzw. vagotomisierten Tieren auch ein qualitativer Unterschied zwischen den beiden zu beobachten.

LITERATUR

1. *Burn, J. H., Dale, H. H.:* J. of Pharm. and Exp. Ther. **6**, 417, (1915).
2. *Hunt, R., Renshaw, R. R.:* J. of Pharm. an Exp. Ther. **25**, 315, (1925).
3. *Hunt, R.:* J. of Pharm. and Exp. Ther. **28**, 367, (1926).
4. *Chou, T. C., De Ellio, F. J.:* Brit. J. Pharm. **2**, 268, (1947).
5. *Paton, W. D. M., Zaimis, E. J.:* Brit, J. Pharm. **4**, 381, (1949).
6. *Paton, W. D. M., Zaimis, E. J.:* Brit. J. Pharm. **6**, 155, (1951).
7. *Gyermek, L., Sztanyik, L.:* Acta Physiol. Hung. **2**, 41, (1951).
8. *Gyermek, L.:* Acta Physiol. Hung. **2**, 175, (1951).
9. *Gyermek, L., Nádor, K.:* Kísérletes Orvostudomány, **4**, 112, (1952).
10. *Nádor, K., Gyermek, L.:* Magyar Kémikusok Lapja **57**, 349, (1951).
11. *Nádor, K., Gyermek, L.:* Acta Chem. Hung. **2** (1952).
12. *Gyermek, L., Nádor, K.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 183 (1952).
13. *Issekutz, B. sen.:* Arch. f. Exp. Path. u. Pharm. **215**, 283, (1952).
14. *Page, I. H., Taylor, R. D.:* J. A. M. A. **135**, 348, (1947).
15. *Page, I. H.:* Am. J. Physiol. **158**, 403, (1949).
16. *Teschendorf, W.:* Biochem. Ztschr. **118**, 267, (1921).
17. *Acheson, G. H., Moe, G. K.:* J. of Pharm. and Exp. Ther. **87**, 220, (1946).
18. *Acheson, G. H., Pereira S. A.:* J. of Pharm. and Exp. Ther. **87**, 273 (1946).
19. *Moe, G. K., Rennick, B. R., Capo, L. R., Marshall, M. R.:* Am J. Physiol. **157**, 158, (1949).
20. *Bernthal, T., Motley, H. E., Schwind, F. J., Weeks, W. F.:* Am. J. Physiol. **143**, 220, (1945).

О ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ ТРОПЕИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ И TEA ПОДОБНЫХ СРЕДСТВ, ПАРАЛИЗИРУЮЩИХ ГАНГЛИЙ

Я. Порсас и Л. Дьердь

Фармакологический институт медицинского университета, Будапешт.

Резюме

1. У нормальных животных N 239 и TEA (Tetraaethylammonium) вызывают значительное понижение кровяного давления. На это действие нельзя повлиять атропинизацией и перерезкой блуждающего нерва.

2. N 239 (p-Brombenzyl-dl-mandelytropinium bromid) и TEA значительно повышают кровяное давление во время инфузии адреналина.

3. Во время инфузии адреналина у животных с перерезанным блуждающим нервом, повышающее действие и N 239 на кровяное давление не проявляется, но в дозах, которые больше первоначальной, N 239 причиняет опять понижение кровяного давления.

4. Во время инфузии адреналина у животных с перерезанным блуждающим нервом, TEA, — в противоположность N 239, — повышает кровяное давление, однако в меньшей мере, чем у животных с невредимым блуждающим нервом.

5. Во время инфузии адреналина у животных, подвергнутых атропинизациии, N 239 в первоначальной дозе не имеет влияния на кровяное давление, но в больших дозах опять снижает кровяное давление. Однако, TEA даже и в этом случае вызывает дальнейшее повышение кровяного давления.

6. Во время инфузии адреналина у животных с перерезанным блуждающим нервом и подвергнутых атропинизации, N 239 понижает кровяное давление, в то время как повышающее действие TEA на кровяное давление и в данном случае наблюдается.

7. Во время инфузии адреналина, мигательная перепонка сокращается и на это явление N 239 в дозах 0,02—1,6 мг/кг не имеет действия, в противоположность этому, в большинстве случаев, TEA вызывает дальнейшее сокращение мигательной перепонки Атропин в дозах 1 мг/кг значительно расслабляет сокращенную мигательную перепонку. Большой дозой N 239 (5,0 мг/кг) вызывается то же самое. Папаверин в дозах 5 мг/кг причиняет меньшее и более короткое время продолжающееся уменьшение тонуса, чем 1 мг/кг атропина. По мнению авторов, уменьшение тонуса не зависит от парализирующего ганглий действия химических соединений.

8. В противоположность TEA, N 239 не приобретает вазопрессорного действия, даже после многократной подачи. По мнению авторов, четвертичные тропеиновые вещества действуют на вегетативные ганглионы не только сильнее чем TEA, но и элективнее.

9. На основании вышеприведенного, авторы резюмируют, что в то время как у нормальных животных прежними экспериментами удалось выявлять лишь количественные разницы между двумя средствами, парализирующими ганглий, то во время инфузии адреналина у животных, подвергнутых атропинизации, или у животных с перерезанным блуждающим нервом, можно было наблюдать также и проявляющуюся между ними качественную разницу.

STUDIES ON CHOLINERGIC BLOCKING SUBSTANCES

III. NEUROMUSCULAR BLOCKING TROPEINES

By

L. GYERMEK and K. NÁDOR

INSTITUTE OF PHARMACOLOGY OF THE MEDICAL UNIVERSITY AND PHARMACO-INDUSTRIAL RESEARCH INSTITUTE, BUDAPEST

(Received: 7, June, 1952)

It has been shown in previous publications (1, 2, 3, 4) that certain tropeins exert a marked blocking action on ganglionar and myoneural synapses. In general, tropeines containing one quaternary ammonium group are in the first place ganglionic blocking, whereas those containing two quaternary ammonium groups are very effective neuromuscular blocking agents.

With compounds of such action the effect is influenced partly by the distance between the two quaternary ammonium groups, partly by the potential distribution of the onium kation (5, 6).

In search for synthetic compounds of curariform action one of the aims is the determination of the optimal molecular structure acting most effectively on acetycholine in the area of neuromuscular synapses. For practical reasons it is also of importance that the active compound should have as wide limits of action as only possible, it should be eliminated rapidly and that its action should be easily suspendable.

Owing to the requirements enumerated, almost exclusively prostigmine or compounds of similar effect have been used up to now.

One group of synthetic compounds possessing curarelike action is formed by compounds bearing two ammonium groups. Of these, those with ammonium groups of chemically simple structure (e. g. a trimethylammonium group) differ in mode of action from compounds in which the quaternary N atom is found in heterocyclic molecules containing oxygen groups as well. The action of compounds belonging to the former group cannot be abolished by prostigmine, while the effect ot those of the latter group can easily be antagonized with prostigmine. The marked curariform action of these compounds is due to the fact that in these compounds the interprosthetic distance, as supplied by the decamethylene chain, is similar to that possessed by d-tubocurarine as well (7, 8, 9, 10).

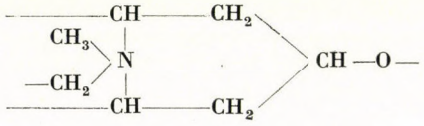
It was found, however, that apart from the distance estimated to amount to 13—15 Å, compounds belonging to the pp'-diamino-diphenyl-methane derivatives may prove to be very active although they possess considerably shorter

interprosthatic distances, and that Novocurarine (1,4-xylylene-bis-trans-benzoyl-tropinium bromide) exerts an even stronger action than the former substances. In the case of Novocurarine, the interprosthatic distance of 8,8 Å is supplied by the 1,4-xylylene chain, while antagonizability is due to the ester group contained in the tropine molecule (12).

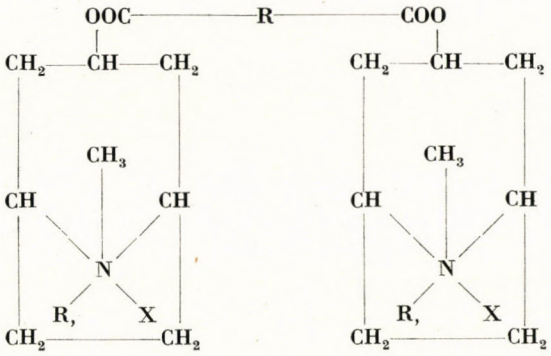
In addition to compounds with tropine structure possessing a curariform action, several dicarbonic acid esters and bis-quaternary derivatives of other simple alcohols have also been produced. Of the latter, succinylcholine proved to be the most effective. This compound possessed a chain length equivalent to that of decamethonium. This findings directed attention to the fact that in the interprosthatic chain there might be not only one polymethylene or xylylene group, but these groups may be substituted by adequate ester bindings as well (13).

Succinylcholine — owing to its acetylcholine character — is very sensitive to choline esterase and thus its action, instead of being antagonized by physostigmine or prostigmine, is enhanced by these substances (14).

Ever since we had planned to synthetise quaternary derivates of the succinyl-tropine and of its aromatic analogon, phtaloyltropine, it has been endeavoured to investigate two questions. First, what changes in action would occur if the cyclic analogon of dimethyl-amino ethanol, the tropine, were subjected to examination. Tropine possesses an acetylcholine antagonizing action in various tropine-ester compounds. Secondly, what is the role played by different quaternary groups in compounds capable of forming bis-quaternary compounds? Up to then, we had been compelled to use the following method for synthetising tropeines. The tropeine selected had been brought into reaction with 1,4-xylylene-bromide that formed the chain. This brought the result that the correlations described by us as found between structure and effect of ammonium groups to bis-quaternary tropeins could not be extended because by this method the following quaternary group was formed



invariably in every case and it was only the ester group, as well as the syn- and anti-positions of the N and O atoms of tropine that we could change to our liking (15). It was for this reason that we attributed significance to the production and investigation of tropeines possessing two N atoms, in which, in addition to the proper chain-distance, there is ample possibility for the tertiary N to react with any of the quaternarizing groups as well. Bearing in mind the above statements, the compounds shown in the Table 1 were produced and subjected to investigations (13).



R = —CH_2—CH_2—

N—297	Methyl-succinyltropinium-diiodide	R, —CH_3	X = J
N—298	p-methylbenzyl succinyltropinium-dibromide	R, —CH_2——CH_3	X = Br
N—307	m-brombenzyl-succinyltropinium-dibromide	R, —CH_2— Br	X = Br

R = 

N—305	Methyl-phtaloyltropinium-diiodide	R, —CH_3	X = J
N—306	Benzyl-phtaloyltropinium-dibromide	R, —CH_2—	X = Br

Methods

The compounds have been tested by the methods generally used for investigating curariform effect. In the frog, substances were injected into the lymph sac and the degree of paralysis caused was measured at 30, as well as at 60 and 90 minutes. The Table shows the doses that leading to paralysis without being lethal. In the rabbit, substances were slowly, injected into the vein of the ear, within a period of 50 to 60 seconds and the dose causing head drop was determined. In case of marked weakening or paralysis of respiration, 0,25 to 0,30 mg/kg of prostigmine, or 0,3 to 1,5 mg/kg of m-oxyphenyl-trimethyl-ammonium iodide were given immediately by the intravenous route. In the cat, substances were tested on muscle-nerve preparations. In Pernocton-Urethane anaesthesia contractions of the gastrocnemius muscle of one limb were studied by means of a myograph with a Marey drum. The ischiadic nerve was stimulated by means of a slide inductor at intervals of 3 seconds. In addition to muscle contraction, breathing was also registered. The compounds were injected intravenously. In the dog, the injections were given into the saphenous vein and the symptoms resulting were studied. In the rat, toxic and lethal doses were determined. The substances were injected into the tail vein within 10 to 20 seconds.

In addition to studying neuromuscular blocking effects, actions exerted on blood pressure, ganglionar synapses, and parasympathetic nerve endings were observed in the cat. The action on parasympathetic nerve-endings was studied in the isolated intestine of the rabbit as well. In Pernoctone-Urethane anaesthesia, blood pressure was measured in the common carotid artery. The blocking action exerted upon superior cervical ganglia was studied on the nictitating membrane, according to *Acheson* and *Moe*'s (17) method. The parasympathetic blocking effect was studied in blood pressure experiments in the cat; it was tested against the fall of blood pressure caused by 0,2 to 1,0 μg/kg of carbachol. This effect was also studied on the isolated intestine of the rabbit against spasm caused by 0,2 to 1,0 μg/cm doses of carbachol.

Experimental

Neuromuscular blocking effects

Doses causing paralysis in the frog are shown in Table I.

TABLE I

N-297.	10 μg/kg
N-298.	5 »
N-307.	2 »
N-305.	15 »
N-306.	1 »
d-tubocurarine	5 »

Doses causing head drop in the rabbit are shown in Table II.

TABLE II

N-297.	100, 150, 400, 540 μg/kg	No head drop
	1,2 μg/kg	Head drop
N-298.	100, 120, 140, 160, 180 μg/kg	No head drop
	160, 190, 250 μg/kg	Head drop
	190, 250 μg/kg	Lethal
N-307.	40, 50, 50, 60 μg/kg	No head drop
	70, 70 μg/kg	Head drop
	(100 μg/kg	Lethal
N-306.	100, 150, 170, 180, 180 μg/kg	No head drop
	200, 200 μg/kg	Head drop

In the rabbit, moderate muscular inertia was caused by doses even smaller than those causative of head drop. This fact, however, is not registered in the Tables. Head drop occurred with the above doses at about 30 to 60 minutes following administration and, in general, it was of 3 to 10 minutes' duration. No side effects were observed.

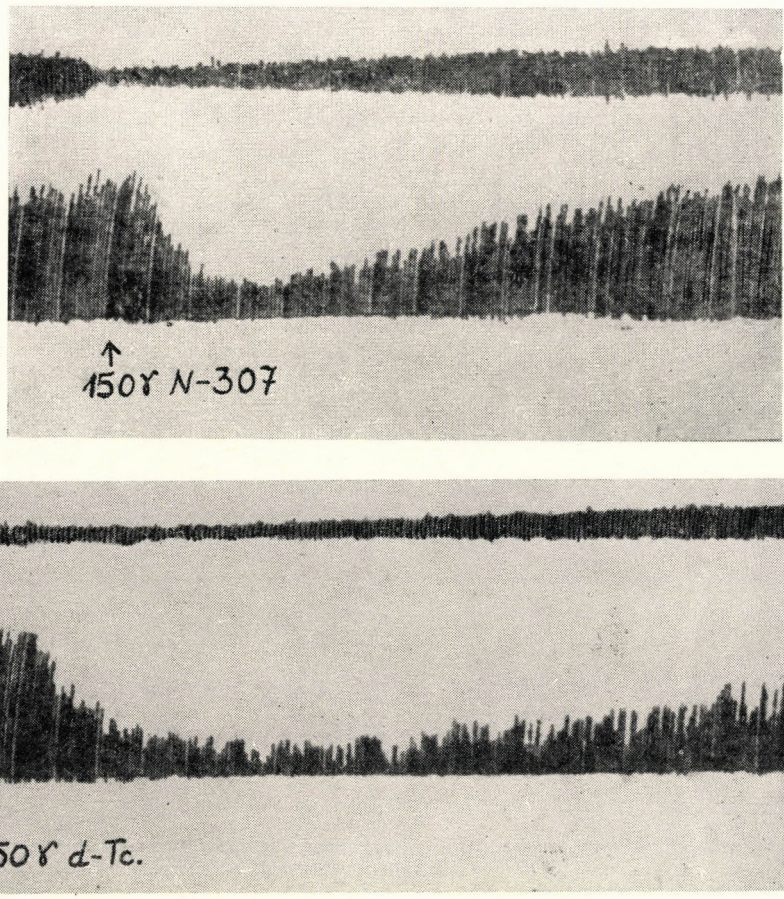


Fig. 1. Cat nerve-muscle preparation. Above: respiration. Below: contractions of the gastrocnemius muscle on stimulation at 3 sec. intervals. d-Tc-means -d-tubocurarine

N-298. Doses of 190 and 250 μg/kg caused following head drop respiratory paralysis. In spite of 0,5 mg/kg of m-oxyphenyl-trimethyl-ammonium iodide administered 3 times within five minutes following the onset of respiratory symptoms, the animals died. The effect of a 160 μg/kg dose causing head drop and reduction of breathing could be mitigated by the intravenous administration of 0,25 mg/kg of prostigmine and 0,5 mg/kg of atropine, but improvement was relatively slow. The animal was free of symptoms within 10 minutes following the administration of the substance.

N-307. A dose of 100 μg/kg caused respiratory paralysis which could not be relieved by 0,5 mg/kg of m-oxyphenyl-trimethyl ammonium iodide given after the onset of symptoms, and the animal died within 5 minutes. The effect of 70 μg/kg causing head drop and complete muscular weakness could adequately be antagonized by 0,5 mg/kg of m-oxyphenyl-trimethyl-ammonium. The animals recovered from paralysis within 30 to 40 seconds and complete freedom of symptoms could be observed in 1 minute.

N-306 caused head drop in a dose 200 μg/kg. This action could be satisfactorily antagonized by the administration of 0,3 mg/kg of m-oxyphenyl-trimethyl ammonium iodide.

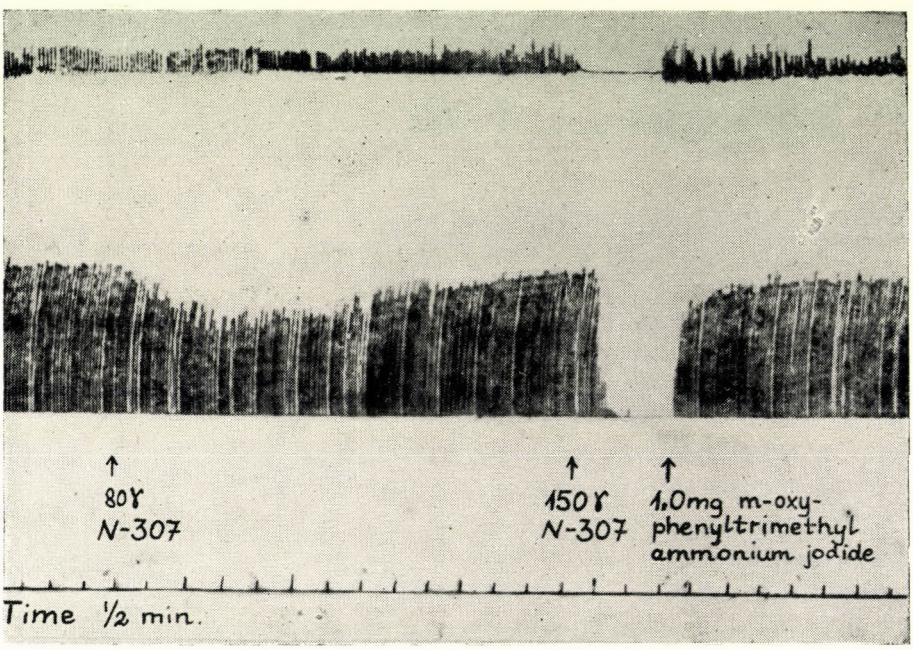


Fig. 2. Cat nerve-muscle preparation. Above : respiration. Belew : contractions of the gastrocnemius muscle on stimulation at intervals of 3 seconds

On muscle-nerve preparations compounds N-296, N-307 and N-306 were tested, utilizing cats.

N-298 in a dose of 200 μg/kg had hardly any effect but there occurred a slight weakening of breathing. Following the administration of 300 μg/kg, contraction of the gastrocnemius muscle was almost completely inhibited. The effect lasted in one case 5 minutes, in the other 10 minutes. There was a slight weakening of breathing. A dose of 400 μg/kg caused complete muscular paralysis : respiration was also paralysed. The action was not antagonizable with m-oxyphenyl-trimethyl ammonium iodide. Compared to tubocurarine, the

compound was found to be about 2,5 times weaker and its effect lasted for a somewhat shorter time. In doses causing similar muscular paralysis, d-tubocurarine produced a more marked respiratory inhibition.

Compound N-307 has been subject to more detailed tests in 10 experiments. Doses of 50 to 80 μg/kg did not inhibit muscular contractions, while 100 to 150 μg/kg brought about marked inhibition of contraction in the muscle. Doses of 150 to 200 μg/kg lead to total muscular paralysis, lasting for 5 to 10 minutes in individual experiments. Compared to d-tubocurarine, the effect of the compound was of shorter duration, while its intensity was similar to that of d-tubocurarine. (Fig. 1, Fig. 2). As to respiratory paralysis, the compound was found to be less effective than d-tubocurarine and its action could be suspended instantly by the administration of 1 mg/kg of m-oxyphenyl-trimethyl ammonium. (Fig. 2). The effect of d-tubocurarine in doses of 150 to 200 μg/kg on nerve-muscle preparation in the cat was found to be identical with that of compound N-307. 200 μg/kg doses of Novocurarine (1,4-xylelene-bis-benzoyl-tropinium bromide) are less effective. (Fig. 3). The action of d-tubocurarine could be antagonized with m-oxyphenyl-trimethyl ammonium in a considerably lesser degree (e. g. Fig. 3).

Contractions of the gastrocnemius muscle were not at all inhibited by a 200 μg/kg dose of compound N-306. After a dose of 400 μg/kg, partial inhibition occurred. (Fig. 4). In contrast to this, 200 μg/kg of d-tubocurarine caused total inhibition. Thus compound N-306 proved to be at least 2 to 3 times less effective than d-tubocurarine.

In the dog, compounds N-298 and N-307 were tested. An intravenous dose of 0,1 mg/kg of N-298 caused muscular inertia 1 minute following administration: the animal lied down. Respiration was satisfactory, but the animal was incapable of standing on its feet. It took five minutes before it was free from symptoms. A 0,08 mg/kg dose of N-307 given intravenously caused dyspnoea within 2 minutes. The animal lied down, having been incapable of standing. Respiration was satisfactory, although somewhat frequent. Secretion of saliva was slightly increased. After five minutes the animal rose spontaneously but stood uncertainly on its legs for a period of 2 to 3 minutes after which time symptoms have completely ceased. However, in the above doses none of the two compounds lead to complete relaxation of the muscles.

In the rat, doses approximating the lethal one were determined by means of intravenous injections. Compound N-297 caused dyspnoea and muscular inertia in doses of 5,0 and 6,0 mg/kg, respectively. 7,0 mg/kg killed the animal within 3 minutes.

N-298. A dose of 2,0 mg/kg caused dyspnoea and weakness of muscles as well as tic. A dose of 2,3 mg/kg killed the animal within 3 minutes.

N-305. A dose of 0,8 mg/kg produced no symptoms. 1,5 mg/kg caused

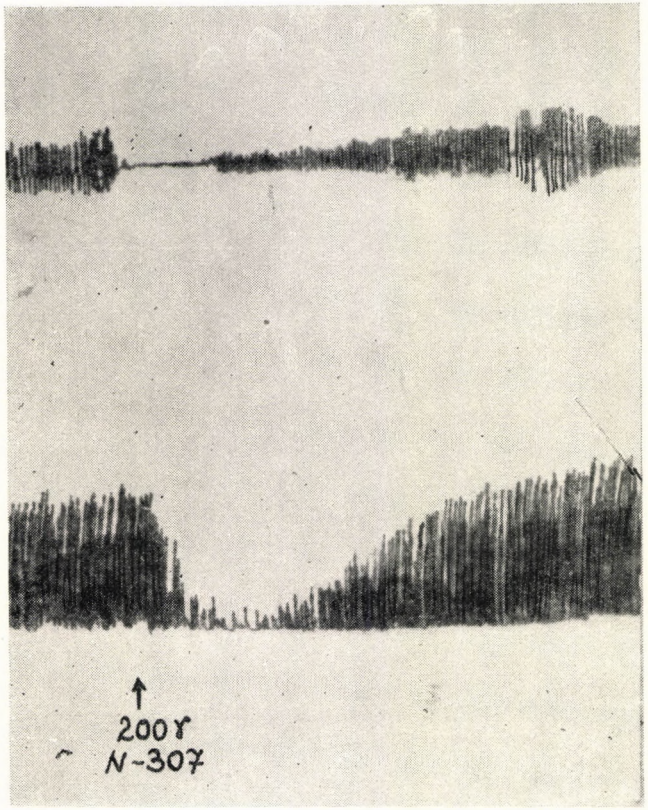


Fig. 3. a

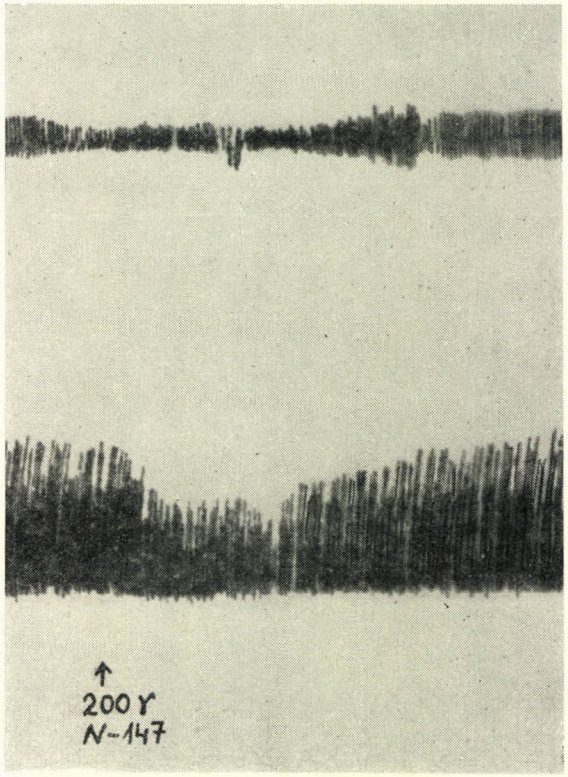


Fig. 3. b

Cat nerve meuscle preparation. Above : respiration. Belov : contractions of the gastrocnemius muscle on stimulation at intervals of 3 seconds R. A. means Arteficial Respiration.

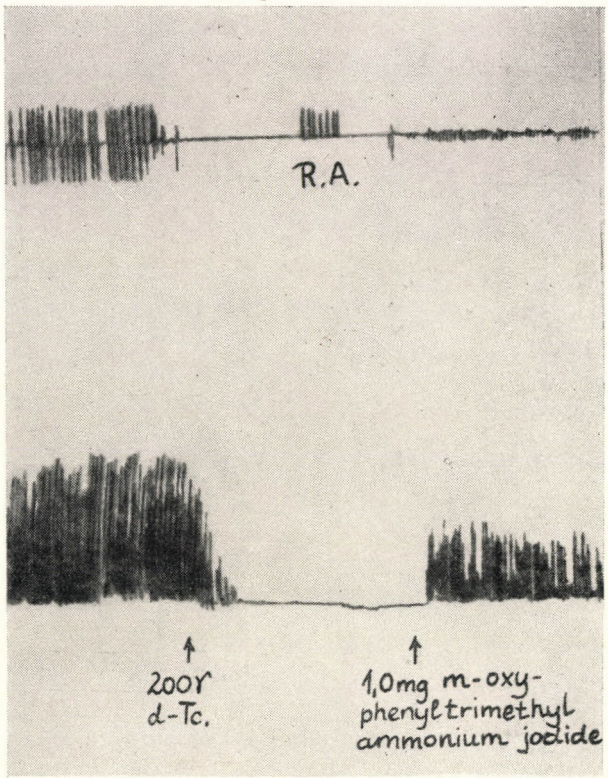


Fig. 3. c. Cat nerve-muscle preparation. Above : respiration. Below : contractions of the gastrocnemius muscle on stimulation at intervals of 3 seconds. R. A. means Artificial Respiration

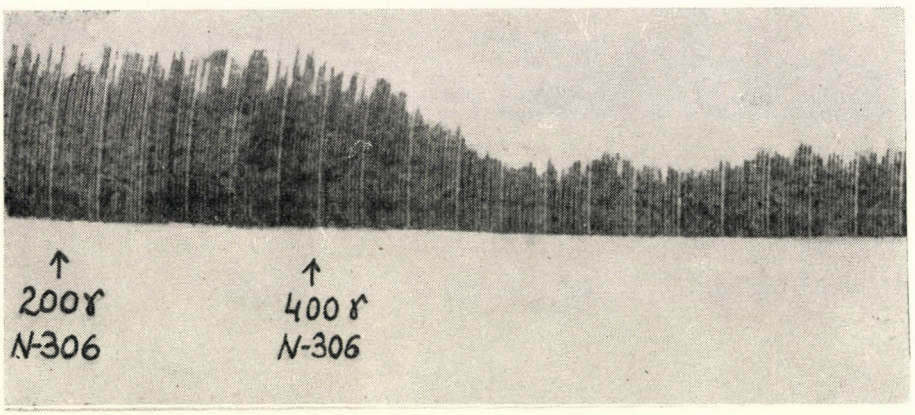


Fig. 4. Cat nerve-muscle preparation. Contractions of the gastrocnemius muscle on stimulation at intervals of 3 seconds

dyspnoea and weakness of muscles. A dose of 2,0 mg/kg was lethal within 3 minutes.

N-306. 0,5 mg/kg caused dyspnoea. 0,85 mg/kg killed the rat within 2 minutes.

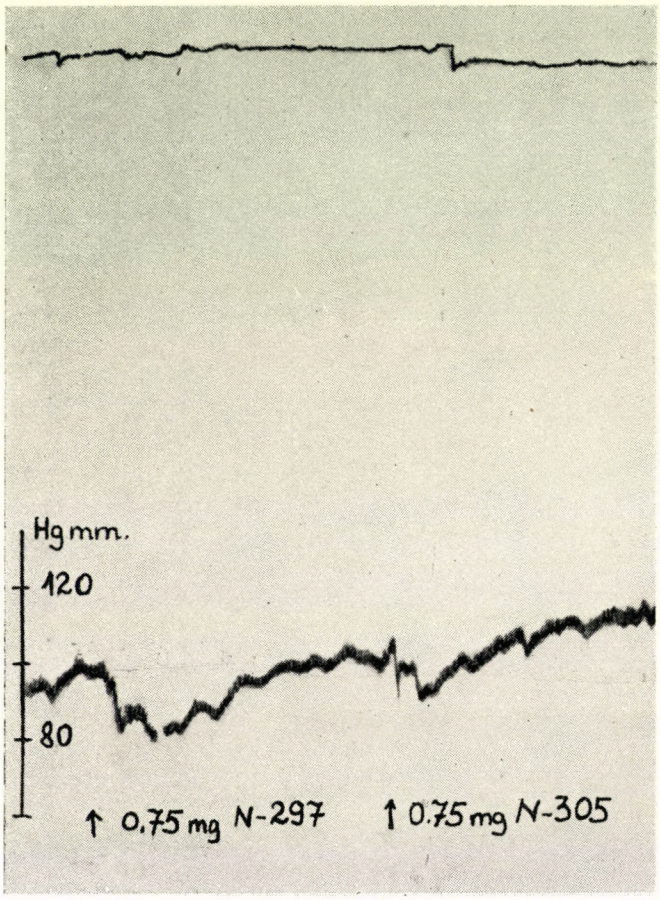


Fig. 5.a

Blood pressure and nictitating membrane of cat. Contractions of the nictitating membrane folloving stimulation at every $^1/_5$ sec. Below, Blood pressure. Above, Nictitating membrane.

N-307. LD_{50} (as calculated according to *Miller and Tainter)* (18) equalled 1,68 $\pm$ 0,08 mg/kg.

Effect on Blood Pressure and on Superior Cervical Ganglion

0,1 to 1,0 mg/kg doses of the above substances given intravenously lowered the blood pressure even in animals previously treated with atropine. The principal cause of the fall in blood pressure is the fact that ganglionic synapses are

being blocked in different degrees. This observation was proved to be valid in experiments on nictitating membrane in cats.

The methylquaternary derivates N-297 and N-298 in doses of 0,2 to 1

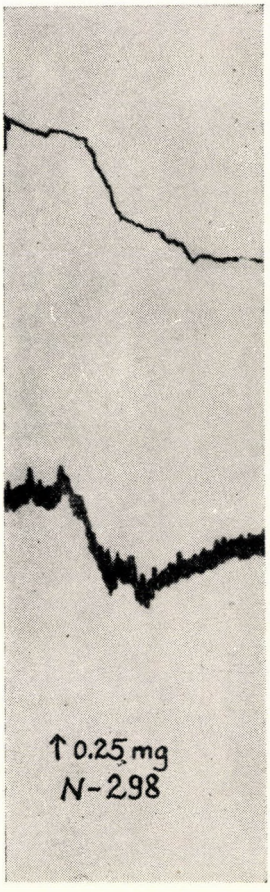


Fig. 5 b

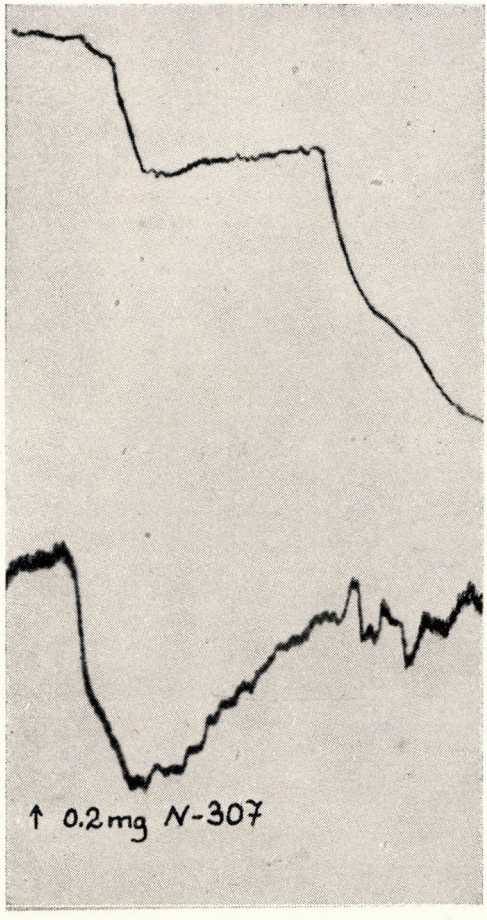


Fig. 5 c

Blood pressure and nictitating membrane of. cat. Contractions of the nictitating membrane folloving stimulation at every 1/5 sec. Below, Blood pressure. Above, Nictitating membrane.

mg/kg slightly lowered the blood pressure. Their blocking action on superior cervical ganglion was also very moderate. The aralkyl-quaternary derivates N-298, N-306 and N-307 in doses of 0,1 to 1,0 mg/kg caused marked diminution of blood pressure, a fall amounting from 30 to 70 mm Hg. In addition, these compounds exerted a blocking action on the upper cervical ganglia as well. The most effective in this respect was compound N-307. (Fig. 5)

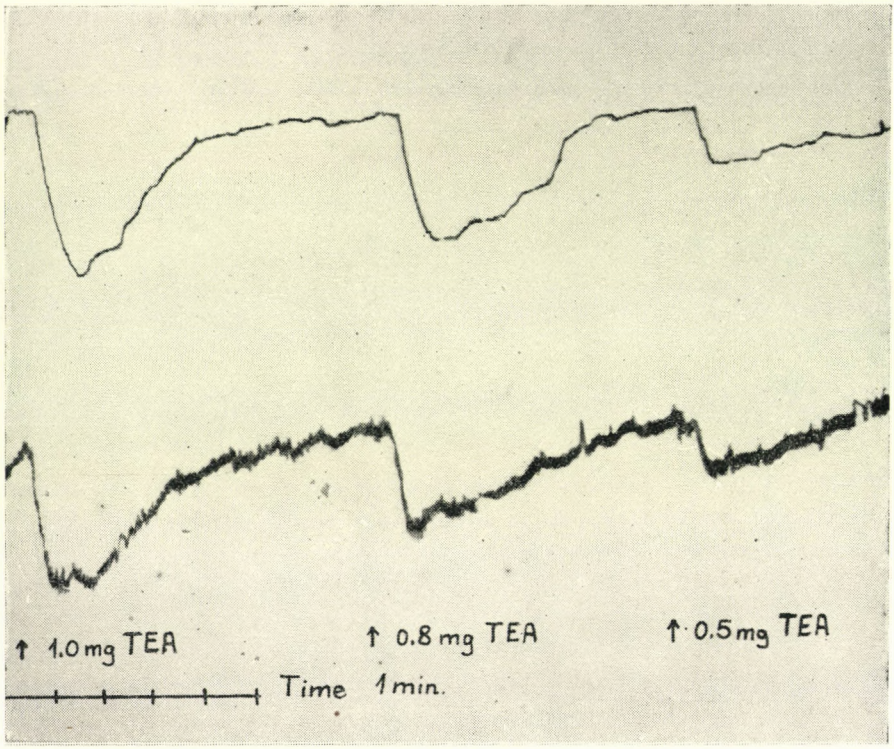


Fig. 5. d. Blood pressure and nictitating membrane of cat. (See Fig 5 a, b, c) Contractions of the nictitating membrane following stimulation at every 1/5 sec. Below: blood pressure. Above: nictitating membrane

The ganglion blocking effect of these compounds, as compared to that of tetramethylammonium bromide, is as follows :

TABLE III

N-298.	0,5
N-298.	2,0
N-307.	3,6
N-305.	0,5
N-306.	1,8

Relative activity was calculated from the means of 3 experiments for each group.

Because of their chemical structure, the action on parasympathetic nerve endings of the compounds was tested as well. In blood pressure experiments carried out in cats, no parasympathetic blocking action could be recorded in comparison with the decrease in blood pressure brought about by Carbachol,

when animals were given 50 to 100 μg/kg of each of the above substances. Compounds N-297 and N-305 in doses of 500 μg/kg caused only a slight diminution of blood pressure and exerted a very moderate inhibitory action on the blood pressure lowering effect of Carbachol. Thus, on basis of blood pressure experiments, compounds N-297 and N-305 proved to be at least 200 times less effective than atropine.

In addition, the above compounds were also tested on the isolated ileum of the rabbit. It has been found that compound N-307 exerted only a mild inhibitory action on parasympathetic nerve endings. On basis of the experiments carried out on isolated intestines, the relative activity of these compounds as compared to that of atropine is as follows.

TABLE IV

N-297.	1/1000
N-298.	1/500
N-307.	1/50
N-305.	1/500
N-306.	1/200

The action against Carbachol is a specific one, considering that the compounds proved to be ineffective against spasms caused by barium chloride.

Discussion

Quaternary derivates of succinyl and phtaloyl tropines, similarly to the other bis-quaternary tropeines hitherto produced (3,9) are in the first place neuromuscular blocking agents. The effect varies in different animals. Especially great were the differences between the results obtained in the frog and in mammals. Compound N-306 (benzyl-phtaloyltropinium bromide) was found to be one of the most effective agents of curariform action hitherto known, since it proved to be five times more effective than d-tubocurarine. In the cat and the dog, however, it proved less effective than compounds N-298 or N-307, which, in their turn, proved to be 2 to 5 times less effective in the frog. Compound N-307 (m-brombenzyl succinyltropinium-bromide) possesses the same efficacy in the dog and in the cat as does d-tubocurarine ; in the rabbit it was found to be twice as effective. As far as results obtained in rabbits are concerned, the compound belongs to the most effective synthetic substances of curariform action. Evaluation of doses causing in the rat paralysis or death revealed that, similarly to other synthetic compounds of a curare-like effect, these compounds

were considerably less effective than d-tubocurarine. Antagonizability of the compound was, in general, better than that of d-tubocurarine, with the exception of compound N-298, that could hardly be antagonized with m-oxyphenyl-trimethyl-ammonium-iodide. This is apparently due to its p-methyl-benzyl group.

According to the results, a connective chain with ester binding results in compounds possessing a marked curariform action, even in the case of tropines. The problem of the structure of quaternary groups deserves even more attention. It may be stated that aralkyl-quaternary compounds have a stronger curariform action than do methyl-quaternary ones. Results given in Table III show that compounds with a marked curariform action exert a strong blocking action on ganglionic synapses as well. Similar correlations had been observed also in the case of different mono- quaternary tropines (4), so that it may be stated that as far as intensity of action upon both neuromuscular and ganglionic synapses are concerned, quaternary compounds containing substituted aralkyl groups proved to be the most effective. This means that the ganglionic blocking effect and the curariform action are to a certain degree in direct proportion to the quaternary structure.

There is a considerable difference between the curariform actions of compounds N-298 and N-307 containing p-methyl-benzyl and m-brombenzyl groups, respectively. The same holds true for monoquaternary compounds possessing different methylbenzyl and brombenzyl groups (19). On the basis of these observation it may be assumed that in the curariform action of aralkyl-quaternary compounds it is not so much the position (m, o, p) of the substituent but rather its character that is of importance.

The tropeines discussed possess beside their strong neuromuscular and less marked ganglionic blocking actions a weak parasympathetic blocking effect as well. In this respect the activities of different compounds follow each other in the same order as in the case of curariform and ganglionic blocking actions. Compound N-307 proved to be the most effective, while N-297 and N-305 the least effective agents. For the time being, more cannot be stated than in experiments on rabbit intestine treated with carbominoylcholine the compounds exerted a mild parasympathetic-cholinergic blocking action. It is possible, however, that this action is not merely an antimuscarine effect, but partly an antinicotinic action, blocking parasympathetic ganglia.

Summary

Certain quaternary derivates or succinyl and phtaloyl tropines were tested to their different cholinergic blocking effects, with consideration to the role played by different quaternary ammonium groups.

(1) The effect of the compounds is in the first place a curariform one. In the frog, compound N-306 (benzyl-phtaloyl-tropinium-bromide) was found

to be the most effective, being five times more active than d-tubocurarine. In the rabbit, dog and cat it was compound N-307 (m-brombenzyl-succinyl-tropinium bromide) that proved the most effective. In the rabbit it has been found to be twice as effective as d-tubocurarine, while in the cat and dog it has shown a similar efficacy as d-tubocurarine. N-307 remained active for a shorter time than d-tubocurarine, and it could be easier antagonized by m-oxyphenyl-trimethyl ammonium iodide than the latter.

(2) The compounds were found to block vegetative ganglia in the order corresponding to the intensity of their curariform action. This effect, however, is weak in comparison with their curariform action. In addition, the compounds exerted some mild parasympathetic blocking action as well.

(3) Succinyl and phtaloyl tropine compounds of the aralkyl-quaternary type were found to be more active at all cholinergic sites of action than methyl-quaternary compounds.

LITERATURE

1. *Gyermek, L., Sztanyik, L.:* Acta Physiol. Hung. **2** 41, 511 (1951).
2. *Nádor, K., Gyermek, L.:* Magyar Kémiai Folyóirat **57** 349 (1951).
3. *Gyermek, L., Nádor, K.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 83, (1952).
4. *Gyermek, L., Nádor, K.:* Kísérletes Orvostudomány, **4**. 116, (1952).
5. *Nádor, K., Gyermek, L.:* Acta Chimica Hung. **2**, 95. (1952).
6. *Taylor, D. B., Holmes, P. E. B., Jenden, D. I.:* Nature **159**, 86, (1947).
7. *Barlow, W. B., Ing, H. R.:* Nature **161**, 718, (1948).
8. *Paton, W. D. M., Zaimis, E. J.:* Nature **161**, 718, (1948).
9. *Kimura, K. K., Unna, K.:* J. Pharmacol. **98**, 286, (1950).
10. *Taylor, D. B.:* Pharmacol. Rewiews **3/4**, 412, (1952).
11. *Nádor, K., Issekutz, L., Gibiszer, K.:* Magyar Kémiai Folyóirat **56**, 435, (1950).
12. *Nádor, K., Issekutz, L., Kovatsits, M.:* Magyar Kémiai Folyóirat **56**, 440, (1950).
13. *Fusco, R., Palazzo, G., Chiavarelli, S., Bovet, D.:* Gaz. Chim. Ital. **79**, 836, (1949).
14. *Castillo, J. C., de Beer, E. J.:* J. Pharmacol. **99**, 458, (1950).
15. *Gyermek, L., Nádor, K.:* In press.
16. *Nádor, K., Gyermek, L.:* In press.
17. *Acheson, G. H., Moe, G. K.:* J. Pharmacol. **87**, 220, (1946).
18. *Miller, L. C., Tainter, M. L.:* Proc. Soc. exp. Biol. Med. **57**, 261, (1944).
19. *Gyermek, L., Nádor, K.:* Acta Physiol. Hung.: **4**, 15) (1953)

ИССЛЕДОВАНИЯ ВЕЩЕСТВ, ПАРАЛИЗИРУЮЩИХ ХОЛИНЕРГ

III. Невромускулярные парализирующие тропеины

Л. Дьермек и К. Надор

Фармокологический институт университета и исследовательский институт фармокологической промышленности, Будапешт

Резюме

Авторы исследовали некоторые четвертичные производные суциниловых и фталоильных тропеинов с точки зрения действий, парализирующих холинерг, принимая во внимание роль различных четвертичных групп аммония.

1. Данные соединения имеют, в первую очередь, кураре подобное действие. У лягушки самое сильное действие имеет бензилфталоил-тропин-бромид, марки N—306,

являющееся в пять раз сильнее, чем d-тубокурарин. У кроликов, собак и кошек самым сильным средством проявлялся m-бромбензил-суцинилтропин-бромид, марки N—307. У кроликов этот препарат действует в два раза сильнее, чем d-тубокурарин, однако у собак и кошек он имеет прибл. одинаково сильное действие. Он действует более короткое время, чем d-тубокурарин и его лучше последнего можно антагонизировать m-окси-фенилтриметиламмоний-иодидом.

2. В порядке последовательности, отвечающей их кураре действию, эти соединения парализируют также и вегетативные ганглии, однако это, по сравнению с их кураре действиями, незначительно. Кроме того, они проявляют незначительное действие и в парализации парасимпатической нервной системы.

3. Суцинил и фталоилтропин соединения четвертичного аралкил типа оказались на всех трех точках воздействия на холинерга более сильными, чем метил-четвертичные.

Microbiologia

THE STRUCTURE OF THE CAPSULE OF B. MEGATHERIUM

By

G. IVÁNOVICS and S. HORVÁTH

INSTITUTE OF MICROBIOLOGY OF MEDICAL UNIVERSITY, SZEGED

(Received: 19, July 1952)

The immuno-specific haptene of the capsule of B. anthracis (1), consisting of a polypeptide made up of D-glutaminic acid radicals (2), was also found in the cultures of some non-pathogenic aerobic mesophilic spore-forming organisms (3). *Ivánovics* reported as early as 1937 that the D-glutaminic acid polypeptide (abbreviated in the following G. A. P.) could also be extracted from the capsule of an aerobic mesophilic bacterium, the size of which had been measured as 3,5—5 × 0,9—1,1 μ. This particular non-identified organism produced a capsule only on media rich in carbohydrate, especially on potato plugs. Using the standard methods recommended by *Smith et al.* (4) for classification of aerobic mesophilic spore-forming bacteria, this organism was identified recently as B. megatherium (5). As it was further found that all strains of B. megatherium freshly isolated from faeces, soil, etc., are capable of producing capsules under appropriate conditions, B. megatherium should be considered as an encapsulated member of the Genus Bacillus (5). *Knaysi* (6) was the first to point out the capsule formation of some dissociants of B. megatherium, and a microphotograph taken by him clearly shows both the capsule and the flagella of the rods. More recently *Tomcsik* and *Guex-Holzer* (7) showed the occurrence of G. A. P. in the capsule of authentic strains of B. megatherium. According to their observations, the capsule of B. megatherium has a complex structure containing both G. A. P. and a polysaccharide. Their conclusion is based upon the capsular swelling reaction of B. megatherium, which is produced by anti-G. A. P. (anti-anthrax serum) as well as by the homologous antibody of this organism. It should be emphasized that *Tomcsik* and *Geux-Holzer* observed a homogeneous capsular reaction with anti-G. A. P. serum, whereas the anti-polysaccharide serum obtained by immunizing rabbits with a homologous B. megatherium strain caused a capsular swelling with a striated structure. *Tomcsik* (8) concluded: »that the cross septa and the other peculiar cell structure appearing after the addition of the homologous antibody are composed of polysaccharide, and that

the polypeptide homogeneously fills the free space between these structures.«

The investigations to be discussed in the following indicate a different conception of the structure of the capsule of B. megatherium. Our data suggest that it has a framework made up of G. A. P. micellae firmly bound to the surface of the bacterium, their interseptal spaces being filled with a polysaccharide which might be considered an intercellular substance.

Material and methods

During the course of our investigations eleven strains of B. megatherium were studied. The identification and character of the strains are described elsewhere (5). The encapsulated cultures of the strains were obtained either on nutrient agar medium containing 10% sucrose (»yellow sugar«) or on tomato-nutrient agar (TN agar). The method of preparing this medium has been published in another paper (5). All the strains investigated produced capsules on TN agar.

The anti-G. A. P. serum was obtained by immunizing rabbits with a heat-killed suspension of encapsulated B. anthracis (9). One ml of the serum gave a maximum yield of precipitate with 0,066 mg G. A. P. The highest dilution of G. A. P. to cause a visible precipitate was 1 : 4 000 000. (0,4 ml of the haptene solution mixed with 0,1 ml serum and kept in a refrigerator overnight.)

The capsular swelling reaction with anti-G. A. P. serum (10) was carried out as follows. TN agar plates were streaked with a spore suspension of B. megatherium and incubated at 37°C for different lengths of time. The growth was scraped off, suspended in saline, and the density of the cell suspension standardized. Each ml of the suspension contained about 50—100 millions of the organisms. One drop of G. A. P. antibody was placed on a slide, mixed with a drop of the suspension and sealed with a cover glass. The preparation thus obtained was examined under a phase-contrast microscope (Zeiss »Lumipan«, 1,25 Num. ap. H. I.).

Electromicroscopical studies were made on young cultures of B. megatherium grown on saccharose nutrient agar. Cultures 5—6 hours old were washed off with distilled water, the suspension centrifuged and the sediment resuspended, then diluted in distilled water. A very thin suspension was dried on a collodion membrane and shadow-casted with gold.

The appearance of the intercellular substance in the colonies of B. megatherium could easily be demonstrated in Indian ink preparations. A loopful of a mucoid colony grown on TN agar was thoroughly mixed with a drop of dilute Indian ink on a slide, sealed with a cover glass and slightly blotted with a piece of filter paper.

Isolation of the intracellular substance: Petri dishes containing TN agar were inoculated with a heavy suspension of the strain investigated and incubated

at 37°C for 20 hours. The mucoid, slimy, confluent colonies were covered with saline (12—15 ml for each culture) and the surface growth carefully removed by means of a bent glass rod, without injuring the medium. The heavy viscous suspension was adjusted to a pH of 7, and the beaker containing the pooled material was kept for 20 minutes at 60°C in a water-bath.

By the end of the heating the viscosity of the suspension has considerably diminished, though the capsules of the bacteria remained intact. The suspension was centrifuged, the supernatant collected, 2 g of sodium acetate added to each 100 ml of the clear, yellow extract and mixed with 2 volumes of ethyl alcohol. It was stored overnight in a refrigerator, then the formed precipitate collected, and the supernatant discarded. The sediment was dissolved in a small volume of distilled water, acidified with acetic acid to a pH of 5, half a volume of chloroform was added, and it was shaken for one hour. After centrifugation the clear watery phase was collected, and the deproteinization with chloroform repeated several times. The protein-free solution was mixed with 2 parts of ethyl alcohol in the presence of sodium acetate, the formed precipitate collected and redissolved in a few ml of water. The turbid solution containing insoluble impurities was cleared by centrifugation and the supernatant precipitated with ethyl alcohol. The precipitate was sedimented by centrifugation, dehydrated with acetone and finally by ether treatment.

The hydrolysis of the substance was carried out with n. H_2SO_4. A 1 per cent solution of the dried substance was made in n. H_2SO_4 and distributed in ampoules. The sealed ampoules were submerged in a boiling water-bath and kept there for different periods of time. The hydrolysates were neutralized with n. NaOH and their reducing power was determined by the Hagedorn—Jensen method. The sugars present were identified by the paper chromatographic technique, using a butyl alcohol-acetic acid-water mixture as solvent. In this case, after the completion of hydrolysis, the sulphuric acid was removed with solid $BaCO_3$. Five μl of the hydrolysate were placed on the filter paper strip and the chromatogramme developed with the solvent. The paper was dried at room temperature, sprayed with a 0,1 per cent solution of p-anisidin (11), and dried for 5 minutes at 105° C.

Experimental

The cultivation of B. megatherium strains on TN agar medium. As we have already described (5), most B. megatherium strains form large (3—5 mm), smooth, soft, glistening, round opaque colonies of a mucoid character (M variant) on TN agar. Recently we have, however, found that some of the strains had a different character. The colonies were smaller (1,5—3 mm in diameter), convex,

opaque, and their surface was not glistening but rather dull, somewhat wax-like (W variant). Colonies of mucoid (M) and non-mucoid (W) variants are shown in Figs. 1 and 2. Four out of 11 strains of B. megatherium investigated appeared in non-mucoid form on TN agar, the others having a more or less decided mucoid character.

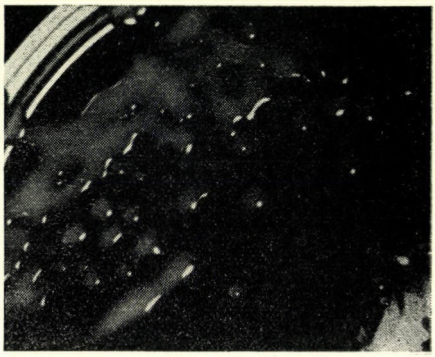


Fig. 1. Strain No. 202 of B. megatherium on TN agar medium (observe the mucoid growth)

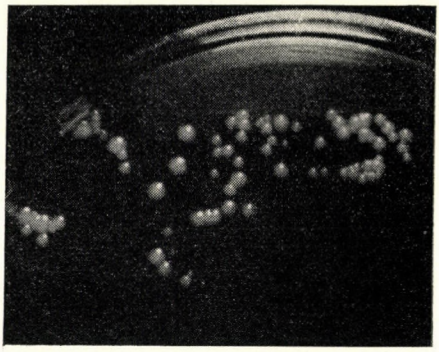


Fig. 2. Strain No. 208 of B. megatherium on TN agar medium (observe the wax-like colonies)

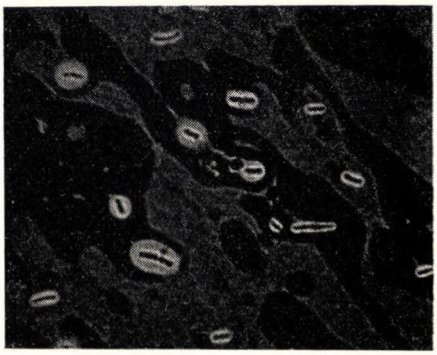


Fig. 3. Indian ink preparation made from strain No. 202 grown on TN agar medium

When prepared with Indian ink, the mucoid and non-mucoid variants differed strikingly from one another. Though the bacteria from mucoid and non-mucoid colonies are both heavily encapsulated, in the Indian ink preparation made from mucoid colonies a great number of very fine, unevenly dispersed granules are to be seen. The bulk of these granules stream freely in the Indian ink if the cover glass is slightly pressed, which means that they are independent of the bacteria, most of the organisms, however, either adhering to them or being imbedded in the mass of granules. It could clearly be seen in the thicker parts of the preparation that the bacteria are imbedded in a heavy intercellular substance, the bulk of which sometimes exceeds that of the cells. The amount of intercellular granules varies from strain to strain, depending on the mucosity of the colony. The cultures of the non-mucoid variant (W) contain no appreciable amount of granules, at any rate their presence is negligible. These observations warrant the conclusion that the formation of two different kinds of colony on TN agar depends on the rate of production of the intercellular substance. Most strains of B. megatherium produce an abundance of it, which in turn is responsible for the mucoid nature of the colony.

Attempts were made to isolate this intercellular material from cultures of strain No. 202 grown on TN agar medium. From one of our experiments, in which the crop of cultures grown in 40 Petri dishes on TN agar served as starting material, 190 mg dried, purified substance was obtained. This readily soluble substance yielded a reduction of 34 per cent, of its own weight on hydrolysis carried out with normal sulphuric acid for 4 hours. Reduction was not increased by further hydrolysis. The nitrogen content of the material was 2 per cent. In solution, the intercellular substance was precipitated by anti-G. A. P. serum up to a dilution of 1 : 10 000, which means that its polypeptide contamination was less than 1 per cent. The hydrolysate of the substance gave a marked ninhydrin reaction, indicating the presence of protein-like impurities not removed by chloroform treatment. The results of the paper chromatographic analysis of the hydrolysate are given in Table I.

TABLE I

Paper chromatographic analysis of the hydrolysate of intercellular substance isolated from B. megatherium (strain No. 202)

Spot	Rf value after		Colour of the spot	Carbohydrate
	2^h hydr.	8^h hydr.		
No. 1	0,075	0,070	light-brown	?
No. 2	0,16	0,13	pink	uronic acid
No. 3	0,19	0,17	light-brown	glucose
No. 4	0,27	0,26	light-yellow	fructose (?)
No. 5*	0,84	0,84	lemon-yellow	?

* appeared already in cold.

The presence of both uronic acid and glucose could be identified by the chromatographic technique. It was found, in addition, that the hydrolysate of the intercellular substance contains three more constituents, probably of carbohydrate nature, which we made no attempt to identify.

Test with anti-G. A. P. serum of the capsular swelling reaction. The capsular reaction with anti-G. A. P. serum was carried out on 11 strains of B. megatherium grown on TN agar medium. It was striking that in most of the strains the serum produced irregularities in capsular reaction. It was frequently observed that most of the encapsulated bacteria showed no capsular reaction, whereas others exhibited a marked capsular swelling, usually homogeneous. However, some of the cultures revealed a surprising picture, the capsule appearing as a striated structure. This was sometimes so pronounced that it could be detected even under an ordinary microscope if the illumination was suitably adjusted by lowering the condenser lens.





Fig. 4. and *5.* Capsular reaction produced by anti-anthrax serum (G. A. P.-antibody) of B. megatherium (strain No. 208) grown on TN agar medium (Under phase-contrast microscope)

The striated structure of the capsule of B. megatherium, produced in addition of anti-G. A. P. to the bacterial suspension, is seen in Figures 4 and 5. It was interesting, however, that this striated structure varied considerably among the different strains, depending somewhat on the culture used. In most cases it varied with the age of the culture and there was often considerable variation even within the same strain. A few strains, however, gave the striated capsular reaction to anti-G. A. P. with great regularity. In the first experiment of our investigations, 15 hour old cultures of 6 different B. megatherium strains grown on TN agar were studied. It was found that 4 strains out of 6 showed a striated capsular reaction, and in the others there was a capsular swelling of homogeneous character. It appeared that the production of the capsular reaction by the anti-G. A. P. serum has at least a certain relationship to the nature of the colonies. A striated capsular structure was regularly observed when the test was made on strains forming non-mucoid (W) colonies on TN agar, whereas the others, the mucoid colonies, usually gave the homogeneous capsular reaction (see Table II).

TABLE II

Properties of different B. megatherium strains grown on TN agar medium for 15 hours

Strain	Form of colony	Size of capsule* (in Indian ink)	Amount of the intercellular substance**	Capsular swelling reaction produced by G. A. P. serum
No. 119	M	+++	+++	Homogeneous
No. 202	M	++	+++	Homogeneous
No. 203	W***	++	+	Slightly striated (granular)
No. 204	W	+++	—	Markedly striated
No. 205	W	+++	+	Moderately striated
No. 208	W	++	—	Markedly striated

* The degree of encapsulation : + = small capsule ; ++ = moderately encapsulated; +++ = heavily encapsulated.

** The amount of intercellular substance as estimated in Indian ink preparation under the microscope.

*** The colonies were of a slightly mucoid character (intermediate form of colony).

The capsular reaction was carried out repeatedly on altogether 11 strains. Five of these regularly exhibited the striated capsular reaction. The striated structure of the capsule in six strains, all of them forming colonies of a very mucoid character on TN agar, was detected only after repeated examination. In these cases a mostly homogeneous capsular reaction was seen, and if a striated structure was observed it was not so marked as in the strains of the W variant. The peculiar striated structure was sometimes found on bacteria from old cultures (30 hours old), but a few strains gave the non-homogeneous capsular swelling only while very young (6—8 hours old). As a result of this systematic study it was shown that the striated capsular structure could be detected with anti-G. A. P. serum without exception, though the result of any individual test depends upon the age and the state of the culture used.

Most of the bacteria obtained from very young (4—6 hours old) TN agar cultures are mobile in hanging drop preparations, and at the same time they have a capsule which gives a homogeneous capsular reaction on the addition of G. A. P. antibody. It is interesting to note that the intercellular granules are not visible in Indian ink preparations made from these very young cultures. Later, at the 6th to 9th hour of cultivation, the intercellular granules begin to form, and the motility of the organisms decreases. With time less and less motile rods are seen, followed by the gradual increase of the intercellular substance. The ageing of the culture is sometimes connected with the appearance of the striated structure of the capsule when the bacteria are mixed with G. A. P. antibody. Attention should be called to the fact that a vague contour of a capsule can be seen around B. megatherium under the phase-contrast microscope if the

bacteria are mixed with normal rabbit or cattle serum. The picture might be misleading, hence a strongly refractile capsule with a distinct contour should be considered as criterion of the capsular reaction.

The amount of intercellular material in the cultures reached its maximum by the 20th to 22nd hour of incubation, when the mucoid nature of the colonies was the most pronounced. After a few hours the glistening surface of the mucoid colonies grows dull, and by the 26th to 30th hour the culture begins to dry. In some cases these old cultures were the most suitable for detecting the striated capsular reaction with the G. A. P. antibody.

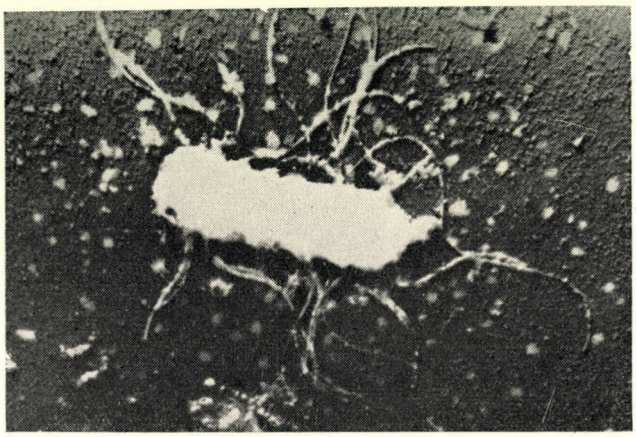


Fig. 6. B. megatherium (Strain No. 119) grown on sucrose agar (× 15 000)

Electronmicroscopical observations. A large number of preparations shadowed with gold were made on sucrose agar cultures of strains No. 112 and 119. Considerable variation in the encapsulation was seen in these preparations. Many of the encapsulated bacilli were found to be of regular shape, with sharp edges, and the presence of the capsule was revealed only by their thickness. Many times the debris to be seen near the cell consists of granules of the intercellular substance. Sometimes these granules adhere to the flagellae and cause them to stick together (Fig. 6). This explains why the intercellular material appears when the motility of the cells decreases. A non-capsulated cell of B. megatherium can be seen in Fig. 7. A very early stage of capsulation is shown in Fig. 8. It is striking that in the early development of the capsule growth does not occur evenly over the whole surface of the bacillus, but rather in the form of separate protuberations. We call special attention to Fig. 9, where a further stage of encapsulation can be seen ; here the segmentation of the capsule is quite remarkable, and the portions of capsule are arranged in rows and separated by intermediate spaces. The demarcation of a portion of intercellular substance is indicated by the arrow. The rugged surface of the capsule is clearly shown in Fig. 10.



Fig. 7. Non capsulated B. megatherium (Strain No. 112, × 9,600)

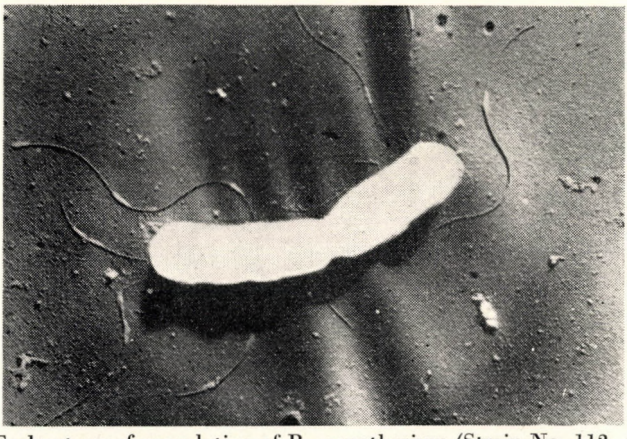


Fig. 8. Early stage of capsulation of B. megatherium (Strain No. 112, × 9,100)

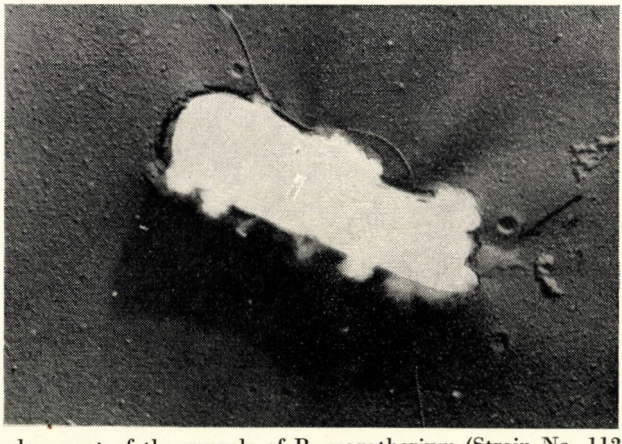


Fig. 9. Development of the capsule of B. megatherium (Strain No. 112, × 13,600)



Fig. 10. Encapsulated B. megatherium (Strain No. 112) grown on sucrose agar (× 10,000)

The electronmicroscopical studies, revealing the peculiar structure of the capsule, harmonize well with both the results of the capsular reaction produced by G. A. P. antibody and the observations made while isolating the intercellular substance.

Discussion

It has long been known that the different aerobic spore-forming bacteria, among them B. megatherium, produce an abundance of a gum-like (polysaccharide) substance on a medium containing carbohydrate (12, 13, 14). *Forsyth* and *Webley* (15) found that the gum produced by B. megatherium on sucrose media is a mixture of levan and glucose-uronic polysaccharide. The extra-cellular mucilage produced by B. megatherium on glucose medium is made up mostly of uronic acid and glucose radicals (16).

As has been observed, the flagellae of B. megatherium develop when the bacteria are still very young and soon after the growth of the G. A. P. capsule has begun. The production of capsular substance is greatly enhanced by the presence of carbohydrate in the medium, and the formation is further promoted by some unidentified thermo-stabile substances occuring in vegetable juices, especially in tomato juice or potato extract (5). On a medium containing mono- or disaccharides, B. megatherium forms an intercellular substance which, however occurs in the culture to any considerable extent only after the appearance of flagellae and the capsular framework of G. A. P. micellae. The increasing amount of intercellular substance makes the flagellae of the bacteria stick together. This explains the immobility of the cells in the comparatively early stages of cultivation.

The intercellular character of the gum-like substance in cultures of B. megatherium was already noted by earlier investigators (15, 17). Our morphological studies and experiments on the extraction of B. megatherium on TN agar culture while preserving the capsule suggest that the chemically non-homogeneous polysaccharide becomes detached from the surface of the cell in the form of fine granules which then may easily be brought into homogeneous solution. This intercellular substance consists of a mixture of several polysaccharides, some of the constituents of which were identified.

Tomcsik and *Guex-Holzer* (7) described a particular type of capsular, swelling reaction in B. megatherium and in a strain of »motile B. anthracis« (18) produced by anti-B. megatherium serum. As the serum used by these authors did not contain G. A. P. antibody, they concluded that the capsules of these bacilli had a polysaccharide framework surrounding the polypeptide. Contrasting with the observations of *Tomcsik*, who failed to produce a capsular reaction of striated structure with G. A. P. antibody, we succeeded in demonstrating that this antibody can produce a striated capsular reaction in B. megatherium, though this particular aspect of the capsular swelling is not always visible and is probably influenced by the amount and state of the intercellular substance. We are inclined to believe that the presence of the gum-like substance prevents the diffusion of the G. A. P. antibody to the homologous haptene micellae, thus inhibiting the antigen-antibody reaction. Electronmicroscopical pictures also revealed a firm framework of capsule, consisting of topically distinct bundles emerging perpendicularly from the surface of the cell. The interseptal spaces are filled with a granular material which has been identified as being of polysaccharide character. As has been observed by *Bruckner* and *Oskolás—Kovács* (19), the purified solution of G. A. P. exhibits stream double refraction, indicating a considerable asymmetry in the peptide molecule. We think that the D-glutaminic acid polypeptide micellae form distinct bundles on the cell surface and that this explains the peculiar structure of the capsule of B. megatherium.

It should be borne in mind that the bacterial capsule is a dynamic phenomenon, the substance of which is gradually going into solution at the periphery (20). It can be assumed that the peripheric part of the G. A. P. micellae gradually breaks off, goes into solution and mingles with the intercellular substance. It is probable that the peptide mixed with the intercellular substance is adsorbed into the surface of the capsule and gives a reaction with the homologous antibody. This may explain why one can so often observe a homogeneous capsular reaction on the addition of G. A. P. serum to the encapsulated B. megatherium.

The electronmicroscopic studies were carried out in the Electronmicroscopic Laboratory of the Hungarian Academy of Sciences (Budapest). The authors are greatly indebted to *M. Gerendás* Director, for his aid and suggestions.

Summary

Microscopical, electronmicroscopical and biochemical studies revealed that the framework of the capsule of B. megatherium is composed of bundles of D-glutinamic acid polypeptid micellae. This fibrillary polypeptide emerges from the surface of the bacterium in bundles at different separate points on the cell, and an intercellular, polysaccharide-type of granular substance flows from the bacterial-surface into the interseptal spaces.

LITERATURE

1. *Tomcsik, L.* and *Szongott, H.:* Zeitschr. f. Immunitätsf., **76**, 214 (1932).
2. *Iványovics, G.* and *Bruckner, V.:* Zeitschr. f. Immunitätsf., **90**, 304, (1937).
3. *Iványovics, G.:* Zbl. f. Bakt., **138**, 211 (1937).
4. *Smith, N. R., Gordon, R. E.* and *Clark, F. E.:* U. S. Dep. of Agriculture, Misc. Publication No. 559, (1946).
5. *Iványovics, G.:* Zbl. f. Bakt. In press.
6. *Knaysi, G.:* J. Bact., **26**, 623, (1933).
7. *Tomcsik, J.* and *Guex-Holzer, S.:* Schweiz. Zeitschr. f. Path. Bakt., **14**, 515, (1951).
8. *Tomcsik, J.:* Experientia **7**, 459, (1951).
9. *Tomcsik, J.* and *Iványovics, G.:* Zeitschr. f. Immunitätsf., **93**, 196, (1938).
10. *Bodon, G.* and *Tomcsik, J.:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **32**, 122, (1934).
11. *Mukherjee, S.* and *Shrivastava, H. C.:* Nature **169**, 330, (1952).
12. *Harrison, F. C., Tarr, H. L. A.* and *Hilbert, H.:* Canad. J. Res., **3**, 449, (1930).
13. *Challinor, S. W., Haworth, W. N.* and *Hirst, E. L.:* J. Chem. Soc. 676, (1934).
14. *Lyne, R. R., Peat, S.* and *Stacey, M.:* J. Chem. Soc. 237, (1940).
15. *Forsyth, W. G. C.* and *Webley, D. M.:* Bioch. J., **44**, 455, (1944).
16. *Aubert, J. P.:* Comp. rend. Acad. Sc., **229**, 477, (1949).
17. *Forsyth, W. G. C.* and *Webley, D. M.:* J. gen. Microb., **4**, 87, (1950).
18. *Tomcsik, J.:* Schweiz. Zeitschr. Path. Bakt., **13**, 616, (1950).
19. *Bruckner, V.* and *Kovács—Oskolás, M.:* Acta Chem. et Phys. Univ. Szeged **1**, 144, (1943).
20. The Nature of the Bacterial Surface, A symposium, Oxford, 1949.

О СТРУКТУРЕ КАПСУЛЫ BACILLUS MEGATHERIUM

Д. Иванович и Ш. Хорват

Патологический и микробиологический институт медицинского университета, Сегед.

Резюме

На основе результатов микроскопических, электронно-микроскопических и биохимических исследований было установлено, что остов капсулы bacillus megatherium состоит из пучков мицелия полипептида D-глютаминовой кислоты. Этот фибриллярноподобный полипептид выделяется в пучках на отдельных точках клеток с поверхности бактерий, а соответственно зазорам вытекает из клеток зернистое межклеточное вещество полисахаридного характера.

Pathologia

CHANGE IN THE ELASTASE CONTENT OF THE HUMAN PANCREAS IN RELATION TO ARTERIOSCLEROSIS

By

J. BALÓ and I. BANGA

I. DEPARTMENT OF PATHOLOGICAL ANATOMY AND EXPERIMENTAL CANCER RESEARCH
MEDICAL UNIVERSITY BUDAPEST

(Received: 9, July 1952)

It has been reported (1) that pancreas of different humans and aminals yield extracts of different elastase activity by the same method of extraction. It follows that different pancreas do not always contain the same amount of the enzyme dissolving elastic fibres. Systematic investigations have therefore been needed to determine the elastase content of the normal pancreas together with the changes in enzyme activity brought about by pathological conditions.

The aim of the present study was to determine how the elastase content of the human pancreas changes in cases of arteriosclerosis. Since in the test tube elastic fibres are dissolved by elastase, it was supposed that in arteriosclerosis, a disease involving disappearance of elastic fibres from the wall of vessels, the elastase content of the pancreas would be above normal. Pancreas from arteriosclerotic patients were therefore studied by determining the elastase activity of the defatted dry substance by exact methods. The result was expressed in elastase units per g pancreas (E. U./g.) The degree of arteriosclerosis was controlled with both gross and microscopical examinations and results were indicated with crosses. Four crosses represent a most advanced arteriosclerosis, while three and two crosses indicate arteriosclerotic changes of less marked severity. Cases with slight changes have not been included, nor have those in which autopsy revealed some infectious disease, considering that toxins of infectious agents may inhibit the enzymic activity of the pancreas. In this group, therefore, elastase was determined mostly in pancreas obtained from cadavers in which arteriosclerosis or diabetes was present at autopsy.

Two control groups have also been set up. The first group consisted of individuals 18 to 41 years old who had died in consequence of accident. The second group shows results obtained from similarly young persons who had

suffered from different diseases but in whom, however, no signs of arteriosclerosis could be found at autopsy.

The group with pancreas of arteriosclerotic patients and the means of the two control groups show great differences even after the possible individual variations have been duly considered and probable errors, and significant differences among the single groups, been all computed.

In the following, the results of investigations and calculations are presented in detail.

Methods

E. U./g : Determination of Elastase Content of the Pancreas

In a previous paper (1), it has been pointed out that for the exact determination of elastase activity in different dry pancreas or powdered defatted pancreas it does not suffice to measure the dissolution of elastin in aquaeous pancreatic extracts, since the results obtained are markedly influenced by the presence of elastase-inhibitor, the action of which can be abolished only by means of acid extraction, dialysis and ammonium sulphate precipitation. Consequently, in the present study elastase activity of the pancreas was estimated in acid extracts from raw pancreas prepared at a ratio of 1 to 2 both in the fresh state and after dialysis. Simultaneously, an acid aquaeous extract was prepared from the acetone-defatted powder of raw pancreas and elastase activity determined prior to and following dialysis. Thus the elastolytic activity of each pancreas was determined in four different experiments, in the following way. A suspension containing 20 mg per ml of elastin prepared as described in another paper (2) was pipetted into centrifuge tubes of known weight and to these 1 ml, 0,5 ml and 0,25 ml amounts of pancreatic extract were added. pH was adjusted by adding 0,5 ml of N/10 pH 10,3 Na_2CO_3-HCl buffer to each tube. The volumes were filled up to 2,5 ml with water. Subsequently 1 : 10,000 solution of merthiolate was added and the mixtures were incubated at 37° C until dissolution became visible. The longest incubation lasted 48 hours. The E. U./g activity of each pancreas was estimated as follows. To 1 g of dry powder generally obtained from 5 g of raw pancreas in both the dry and the raw state, 5 ml of N/10 pH 4,7 acetate buffer were added and the mixture extracted for 15 minutes under continuous stirring. After centrifuging part of the extracts was adjusted with NaOH to pH 10 and the elastase activity determined by the method described above, 1 E. U. corresponding to the amount of elastase capable of dissolving 1 mg of elastin within 30 minutes, under the experimental conditions stated. Another part of the extracts was dialysed against running water at 16° C for 24 hours. Following dialysis the elastase activity of extracts adjusted to pH 10 was measured. In a great number of cases elastase activity could be demonstrated only after dialysis : in these cases, however, the activity of the

pancreas was invariably low. Specimens yielding values of 50 E. U./g or more possessed about the same elastase activity in the raw extract without dialysis as could be obtained after dialysis.

Results

In Table I are summarized the index number, age, name, sex, cause of death and E. U./g content of the pancreas of individuals died in consequence of accidents. Pancreas and aorta of these subjects were obtained from the Institute of Forensic Medicine. Of the many cases examined the elastase content of the pancreas of persons under the age of 41 years is only included in the Table, since in the vascular system of these individuals no changes indicating arteriosclerosis could be detected by either gross or microscopical examinations. (According to patho-histological studies, in subjects above forty years of age changes in the vascular system can be demonstrated in most cases.) Ten cases belonged to this group. The mean and the probable error were computed, giving the result of 208 ± 56.

TABLE I

Elastase content of pancreas of individuals died in consequence of accident

No	Index No.	Name	Age years	Sex	Cause of death	E. U/.g
1	42	N. J.	25	male	Pressed to death by elevator ...	280,0
2	44	F. L.	38	male	Run over by automobile. Fracture of skull	340,0
3	46	B. V.	39	male	Motorcycle accident	280,0
4	49	S. B.	26	male	Automobile accident	180,0
5	54	F. J.	35	male	Crush syndrome	150,0
6	55	J. D.	35	male	Mortal bleeding.....	330,0
7	73	T. E.	25	female	Suicide	100,0
8	95	T. K.	41	male	Suicide	140,0
9	97	L. J.	18	male	Struck by electric current	120,0
10	98	Cs. G.	31	male	Suicide	160,0

Mean and probable error = 208 ± 56

Material shown in Table II originated from the autopsy material of our Institute, from the cadaver of patients who had died of various diseases. In none of these cases was there demonstrable arteriosclerosis present. Fourteen

cases belong to this group. Mean and probable error were found to be 155 ±49, which does not diverge greatly from the results shown in Table I, and, as seen from a comparison with Table IV, there was no significant difference between the two groups.

TABLE II

Elastase content of the pancreas of individuals free from arteriosclerosis

No.	Index No.	Name	Age	Sex	Cause of death	E. U./g
1	9	L. L.	35	male	Meningeal haemorrhage.....	280,0
2	15	T. D.	39	female	Brain tumor	240,0
3	30	K. J.	39	male	Endocarditis	160,0
4	31	B. K.	23	male	Abscess of the lung	200,0
5	32	Sz. T.	32	male	Heart failure	120,0
6	36	B. K.	16	male	Subacute nephritis	200,0
7	38	B. K.	31	male	Abscess of the lung	50,0
8	40	Sz. J.	36	male	Abscess of the lung	120,0
9	47	S. R.	41	male	Pericarditis.....	210,0
10	56	M. T.	25	male	Pulmonary tuberculosis.....	250,0
11	82	U. I.	26	male	Pulmonary tuberculosis.....	150,0
12	92	P. M.	39	female	Anaemia	40,0
13	93	K. A.	48	male	Congenital heart failure	80,0
14	100	F. L.	45	male	Abscess of the lung. Endocarditis	80,0

Mean and probable error = 155 ±49

Table III shows the elastase content of pancreas obtained from cases in which serious arteriosclerosis could be found in the vascular system. In this Table the degree of arteriosclerosis is also indicated, according to the scheme detailed in the introduction. 36 cases belong to this group, and in 14 of these (54 per cent) no elastase was demonstrable in the pancreas at all, either in the raw extracts or following dialysis. In the rest of the cases the values varied between 5 and 32 E. U./g. Here the mean and probable error were found to be 9 ±6,5. This group, as shown in Table IV, gives a significant difference with the means computed from the values of Table I as well as Table II. The significant difference between the values of Table I and Table III is 3,5, while that

TABLE III

Elastase content of the pancreas in cases of arteriosclerosis

No	Index No.	Name	Age yrs.	Sex	Diagnosis	E. U./g	Degree of arterio-sclerois
1	2	K. P.	53	male	Arteriosclerosis	0,0	++++
2	4	K. Gy.	59	male	Arteriosclerosis	0,0	++++
3	5	Mrs. W. R.	79	female	Arteriosclerosis	0,0	++++
4	13	R. J.	54	female	Cerebral arteriosclerosis ..	20,0	++
5	20	B. G.	70	male	Coronary sclerosis	0,0	++++
6	27	H. P.	64	male	Arteriosclerosis	0,0	++++
7	34	R. G.	62	male	Essential hypertension ..	0,0	++++
8	35	Mrs. M. J.	46	female	Arteriosclerosis	0,0	+++
9	41	B. Zs.	65	male	Arteriosclerosis	25,0	+++
10	53	K. H.	65	male	Diabetes mellitus Arterio-sclerosis	0,0	++++
11	1	Sch. F.	59	male	Thromboangitis	0,0	++++
12	3	V. J.	54	female	Diabetes mellitus	30,0	++
13	8	Sz. J.	66	male	Diabetes mellitus	10,0	+++
14	10	Mrs. G. J.	69	female	Diabetes mellitus	32,0	++
15	11	Mrs. V. E.	79	female	Brain haemorrhage	0,0	+++
16	12	K. G.	59	male	Ileus, paralytic	16,0	++
17	19	T. N.	62	male	Tumor oesophagi	7,0	++
18	23	Mrs. J. H.	70	female	Diabetes mellitus	9,0	++
19	37	R. E.	68	male	Tumor metastases	20,0	++
20	39	A. T.	79	female	Pulmonary embolism	20,0	++
21	6	C. J.	36	male	Essential hypertension ...	25,0	++
22	18	H. J.	46	male	Tumor of stomach	0,0	++++
23	35	Mrs. M. J.	46	female	Arteriosclerosis	0,0	++++
24	25	K. L.	45	male	Heart failure	5,0	++
25	59	Mrs. E. H.	61	female	Ovarian cancer	20,0	++
26	61	S. J.	65	male	Endocarditis	7,0	+++
27	66	Mrs. F. B.	57	female	Coronary thromb. Arterio-sclerosis.....	8,0	+++
28	67	R. F.	64	male	Brain haemorrhage Arterio-sclerosis.....	0,0	++++
29	70	A. D.	60	female	Brain haemorrhage	5,0	++++
30	72	B. A.	75	male	Uraemia. Art. scler.....	0,0	++++
31	75	Mrs. P. J.	76	female	Nephrosclerosis Peritonitis.	10,0	+++
32	76	M. E.	59	male	Arteriosclerosis	5,0	++
33	80	Sch. J.	59	male	Hypertension. Myodeg. cordis	10,0	+++
34	81	G. N. L.	89	male	Diabetes mellitus Arterio-sclerosis.....	10,0	+++
35	83	O. Ö.	70	male	CC. of lung. Art. scler....	10,0	++
36	88	Mrs. Gy. M.	60	female	Diabet. mell. Art. scler. .	20,0	++

Mean and probable error $9 \pm 6{,}5$

between Table II and III is 2,95. It can be taken for granted that the decrease in, or disappearance of, elastase content in the arteriosclerotic group was not a matter of chance.

TABLE IV

Significant difference between elastase contents of the three groups tested, as calculated from the means and probable errors of the Tables

	Significant difference
Between Tables I and II	0,7
Between Tables I and III	3,5
Between Tables II and III	2,95

Discussion

As pointed out in the introduction, it had been expected that in the pancreas of persons suffering from arteriosclerosis the amount of elastase would be increased. Contrary to the supposition, a reduction in the amount of elastase or, in 54 per cent of the cases, even its complete disappearance was observed.

Our knowledge of enzymes shows in general that the same enzymes which are of decisive significance in decomposing a substance may also katalyse the synthesis of it. The destruction of elastic fibres throughout the whole vascular system in arteriosclerosis might, therefore, be brought into correlation with our findings, if it is assumed that in arteriosclerosis the metabolism of the elastic fibres of the vascular system is disturbed owing to the absence of elastase demonstrable in the pancreas. As a result of this, regeneration of the elastic fibres would become deficient. Thus disturbances that lead to the ageing of elastic fibres may be brought into correlation with the lack of elastase. These disturbances form, according to our belief, the basis of arteriosclerosis.

In the human organism, proteolytic enzymes are formed by the glands of the digestive tract. It was the intestinal juice in which we could demonstrate elastase for the first time. It remains to be investigated whether the production of elastase is a function of the pancreas alone or if elastases of different origin exist in the intestinal contents. *C. Eijkman* (3) prepared a medium from the lung of the calf, the nuchal ligament and the wall of the aorta for studying the elastolytic properties of bacteria, and could demonstrate a number of bacteria capable of dissolving elastic fibres. This fact may be of importance, because numerous bacteria contained in the bowels might also possess such properties. The problem merits further investigation.

In the pancreas of some individuals belonging to the non-arteriosclerotic group (Table II) the elastase content was found to be rather low. In this connection reference must be made to observations concerning enzyme inhibitors. From among these *Baló* and *Lovas* (4) found significant variations in activity of pancreatic lipase, trypsin and diastase in individuals who had died of different diseases. For instance, in tuberculosis the amount of all three enzymes listed above was markedly reduced in the pancreas. This observation is in accordance with those made by *Bach* and *Lustig* (5) on serum lipase and with the results obtained by *Bach*, *Lovas* and *Neufeld* (6) on tyroxine. It may be assumed that the amount of elastase in the pancreas has been reduced together with, or independent of, other enzymes as a consequence of toxin action.

There is another phenomenon worth consideration that may affect the enzyme content of the pancreas. Lipomatosis is frequently present in the pancreas of individuals suffering from arteriosclerosis. In such cases fat takes the place of the glandular tissue in the pancreas and glandular elements are found in the form of dispersed islands only. According to investigations carried out by *Baló* (7), lipomatosis develops in the way that glandular tissue destroyed by focal necrosis is being substituted by fat tissue. The elastase content of such a pancreas is very low.

Should further investigations support the role assumed by us to elastase in the development of arteriosclerosis, it would be reasonable to introduce elastase substitution therapy for the prevention of arteriosclerosis.

Summary

1. The elastase content of the pancreas of human cadavers was determined by means of a method worked out previously.

2. In the first group, consisting of individuals who had died in consequence of accidents, the elastase content of the pancreas amounted to values of 100 E. U./g or more in each case, the average having been 208 $\pm$56.

3. In the second group have been summarized values of elastase activity in the pancreas of individuals who had succumbed to different diseases but had possessed a normal vascular system. The pancreas of such persons was also found to yield high elastase values, on the average E. U./g=155 $\pm$49.

4. The third group was composed of individuals suffering from severe arteriosclerosis. In 54 per cent of this group the pancreas did not contain elastase at all and in the remaining 46 per cent values were very low, on an average 9 $\pm$6,5 E. U./g.

5. According to the investigations, arteriosclerosis may be brought into correlation with the disappearance of elastase from the pancreas.

LITERATURE

1. *Banga, I.* és *Baló, J.:* Kísérl. Orvostud. **2,** 271 (1950).
2. *Banga, I.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 317 (1952)
3. *Eijkman, E.:* Zbl. Bact. (Orig.) **35,** 1 (1904).
4. *Baló, J.* and *Lovas, L.:* Virch. Arch. **288,** 326 (1933).
5. *Bach, E.* and *Lustig, L.:* Virch. Arch. **280,** 325 (1931).
6. *Bach, E., Lovas, L.* and *Neufeld, L.:* Arch. f. exp. Path. und Pharm. **165,** 614 (1932).
7. *Baló, J.:* Virch. Arch. **273,** 320 (1925).

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭЛАСТАЗА В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ЧЕЛОВЕКА ВСЛЕДТВИЕ АРТЕРИОСКЛЕРОЗА

И. Бало и И. Банга

Паталогоанатомический и экспериментальный ракоисследовательский институт № 1 медицинского университета, Будапешт

Резюме

1. Авторы определяли содержание эластаза в поджелудочной железе человеческих трупов по уже предварительно выработанному ими методу.

2. В первой группе приводятся данные содержания эластаза в поджелудочной железе молодых, здоровых людей, умерших вследствие несчастных случаев. Эти данные показывают, что E. U./g в каждом случае является величиной в сто, или выше ста. В среднем 208 ± 56.

3. Во второй группе резюмируется активность эластаза в поджелудочной железе людей, умерших вследствие различных болезней, но имевших невредимую сосудистую систему. Эти поджелудочные железы имеют также высокое содержание эластаза. Средняя величина: E. U./g $= 155 \pm 49$.

4. В третьей группе содержатся величины E. U./g поджелудочных желез людей, страдавших тяжелым артериосклерозом. В 54% всех исследованных случаев этой группы поджелудочные железы совершенно не содержали эластаза, а в остальных 45% величины E. U./g были весьма низкими. В среднем E. U./g $= 9 \pm 6{,}5$.

Согласно вычислениям показывается значительная разница между группами I и III, или же II и III, но между группами I и II значительой разницы не имеется.

5. На основании данных этих исследований, можно артериосклероз приводить в связь с исчезновением эластаза в поджелудочной железе.

NOVOCAINAZOPROTEIN UND NOVOCAINALLERGIE

Von

P. ADLER, T. BÁNYÁSZ, T. JÁVOR, L. KESZTYÜS, M. SIMON, T. SZILÁGYI, E. VARGA und ST. WENT

PHYSIOLOGISCHES UND PATHOPHYSIOLOGISCHES INSTITUT, STOMATOLOGISCHE UND DERMATOLOGISCHE KLINIK DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, DEBRECEN

(Eingegangen: am 5. Juni 1952)

I.

Die Herstellung synthetischer Eiweissverbindungen der verschiedenen biologischen und pharmakologischen Wirkstoffe ermöglicht die Anwendung von immunochemischen Methoden in bisher unzugänglichen Gebieten der Biologie und Medizin. Anlässlich der Untersuchung der Eigenschaften dieser Komplexe war die praktisch überaus wichtige Frage zu entscheiden, ob durch derartige künstliche Antigene produzierten Antikörper die biologische oder pharmakologische Wirkung des an das Protein gebundenen aktiven Stoffes beeinflusst wird, oder nicht.

Die Untersuchungen von *Harington* u. Mitarbeiter (1) sowie von *Went* u. *Kesztyűs* (2) haben darauf hingewiesen, dass die natürlichen und künstlich hergestellten Eiweissverbindungen des Thyroxins sich in den immunisatorischen Vorgängen als chemospezifische Antigene verhalten, weiterhin, dass auf parenterale Verabreichung der Thyroxylproteine Antikörper erzeugt wurden, welche einen manifesten antagonistischen Einfluss gegen die stoffwechselsteigernde Wirkung des Thyroxins ausübten. — Künstliche Eiweissverbindungen des Histamins wurden von *Fell* u. Mitarbeitern (3), sowie von *Went* u. *Kesztyűs* (4) hergestellt. Immunisierungsversuche mit diesen Histamin-Eiweiss-Komplexen haben ebenfalls gezeigt, dass das Histamin durch die entstandenen chemospezifischen Antikörper gänzlich oder partiell inaktiviert wird (5). — Das von *Went* u. *Kesztyűs* hergestellte p-Amino-benzolazohistamin-azoprotein bewährte sich auch in der Therapie allergischer Erkrankungen (6, 7, 8). Durch Herstellung eines Aminoderivates des Adrenalins (9) konnte auch dieser Wirkstoff mit Eiweiss gekuppelt werden. In Immunisierungsversuchen verhielten sich die Adrenalylazoproteine ebenfalls als chemospezifische Antigene; die Beobachtungen bezüglich der adrenalininaktivierenden Wirkung der Adrenalylazoprotein-Antikörper sind aber nicht ganz eindeutig (10, 11). — Im Laufe der folgenden Jahre wurden die Eiweissverbindungen von mehreren pharmakologischen und biologischen Wirkstoffen hergestellt und in dieser Beziehung untersucht. — *Harington* u. Mitarbeiter (12) haben Acetylsalicylsäure mit Proteinen gekuppelt und festgestellt,

dass die durch dieses Antigen erzeugten Immunsera imstande waren die antipyretische Wirkung des Aspirins auf Ratten, die infolge von Hefeinjektionen fieberten, zu neutralisieren. *Hooker* u. *Boyd* (13) konnten durch Kuppelung vom diazotierten Monoaminostrychnin mit Hämocyanin ein konjugiertes Antigen darstellen, mit welchem vom Kaninchen spezifische Präzipitine für Strychnin erhalten wurden, die Sera waren aber nicht imstande, die tödliche Wirkung des Strychnins auf Mäuse zu neutralisieren. Ebensowenig bewirkten die Antisera eines Antigens — hergestellt aus diazotiertem Nitrosomorphin und Ovalbumin — ein Auslöschen der Morphinwirkung. Die Versuche von *Berger* u. *Erlenmeyer* (14) mit Dimethyl-pyrrol-phenyl-arsinproteinen und die von *Mooser* u. *Grilliches* (15) mit Androstendiol-proteinen wurden durch die gleichen Misserfolge begleitet.

Die bisherigen Erfahrungen weisen darauf hin, dass die immunologische Inaktivierung eines biologisch wirksamen Haptens im Wesen nicht in einer Antigen-Antikörper Reaktion besteht, sondern vielmehr als eine zufällige Begleiterscheinung derselben anzusehen ist. Es ist denkbar, dass die Wirkung biologischer Wirkstoffe durch eine immunologische Reaktion nur in dem Falle inaktiviert wird, wenn die für die biologische oder pharmakologische Wirkung verantwortliche Gruppe mit den spezifitätsbestimmenden Determinanten identisch ist.

Nachfolgend wird über die Herstellung und die immunologischen Eigenschaften eines neuen derartigen Komplexes, und zwar des Novocainazoproteins, und anschliessend über die unmittelbaren klinischen Auswirkungen der mit dessen Hilfe gewonnenen Erkenntnisse berichtet.

II.

Die Verbindung mit dem Eiweiss wird durch das Diazoniumsalz des Wirkstoffes bewerkstelligt, welches nach den Anweisungen von *Gardner* und *Joseph* (16) auf folgende Art dargestellt wurde: 0,5 g Novocainhydrochlorid (Hydrochlorid des p-Aminobenzoyldiäthylaminoäthanols) wird in 10 ml Wasser + 1 ml konz. Salzsäure gelöst. Die Lösung wird auf 0° gekühlt. Unter ständigem Rühren gibt man so lange eine molare Natriumnitritlösung zu, bis man mit Jodkali-Stärke-Probepapier eine positive Reaktion erhält. 100 ml Rinder- oder Pferdeserum werden unter Zusatz von 100 ml normal Natriumkarbonatlösung alkalisiert. Das Diazoniumsalz wird unter Eiskühlung und ständigem Rühren tropfenweise zugesetzt. Nach 10 Min. Stehen wird das Novocainazoprotein aus der schwarzroten alkalischen Lösung mit Salzsäure gefällt, der Niederschlag filtriert, gewaschen, mit Wasser zerrieben und unter Zusatz von wenig NaOH wieder in Lösung gebracht. Durch Zusatz von konz. Alkohol wird die Fällung noch zweimal wiederholt und der Niederschlag jeweils in Lauge aufgelöst. Zum Schluss erfolgt eine nochmalige Fällung mit HCl, der entstehende Niederschlag

wird mit Wasser verrieben und in Alkali gelöst. Die Lösung wird nun durch Zusatz von HCl gegen Phenolphtalein neutralisiert, filtriert und auf 200 ml ergänzt. Sie enthält 3% Azoprotein.

Zur Klärung der Chemospezifität haben wir mit Novocain-Pferde- und mit Novocain-Rinderserum-Azoprotein je 6 Kaninchen immunisiert. Innerhalb 18 Tagen haben die Tiere in je 5 Injektionen eine Gesamtmenge von 42 ml Azoproteinlösung erhalten. Blutentnahme 8 Tage nach der letzten Injektion. Die Chemospezifität der entstandenen Antikörper wurde vermittels Präzipitationsreaktionen geprüft, u. zw. mit normalem Pferde- und Rinderserum, Novocain-Pferde- und Novocain-Rinderserum-Azoprotein sowie mit den entsprechenden Immunsera. Die Ergebnisse sind in Tab. I. zusammengefasst.

TABELLE I.

Immunsera	Nr.	Antigene			
		Novocain-rinderserum-azoprotein	Novocain-pferdeserum-azoprotein	Natives Rinderserum	Natives Pferde-serum
		Präzipi ation Titer-Verdünnung			
Hergestellt durch intravenöse Verabreichung von Novocain-rinderserumazoprotein	1	1 : 1200	1 : 800	∅	∅
	2	1 : 15000	1 : 10.000	∅	∅
	3	1 : 1200	1 : 1200	∅	∅
	4	1 : 1200	1 : 1600	∅	∅
	5	1 : 2500	1 : 2000	∅	∅
	6	1 : 1200	1 : 1200	∅	∅
Hergestellt durch intravenöse Verabreichung von Novocain-pferdeserumazoprotein	7	1 : 500	1 : 500	∅	∅
	8	1 : 3200	1 : 2400	∅	∅
	9	1 : 400	1 : 400	∅	∅
	10	1 : 1200	1 : 1200	∅	∅
	11	1 : 800	1 : 1200	∅	∅
	12	1 : 1600	1 : 1600	∅	∅
Hergestellt durch intravenöse Verabreichung von Rinder-serum	13	∅	∅	1 : 16000	∅
	14	∅	∅	1 : 4000	∅
Hergestellt durch intravenöse Verabreichung von Pferde-serum	15	∅	∅	∅	1 : 6000
	16	∅	∅	∅	1 : 6000

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, reagierten die mit Novocain-Rinderserumeiweiss hergestellten Kaninchenimmunsera gleich stark mit Novocain-Rinder- und mit Novocainpferdeserum-Azoproteinen; sie reagierten aber weder mit nativem Rinder- noch mit nativem Pferdeserumeiweiss. Ebenso

reagierten die mit Novocain-Pferdeserumeiweiss hergestellten Kaninchenimmunsera sowohl mit Novocain-Pferdeazoprotein, wie auch mit Novocain-Rinderazoprotein, sie reagieren aber nicht mit nativem Pferde- und Rinderserum. Daraus folgt, dass die Novocainazoproteine sich wie chemospezifische Antigene verhalten, deren serologische Spezifität durch die Novocaingruppe determiniert wird.

Zur weiteren Untersuchung der Chemospezifität wurden auch die *Landsteiner*'schen Präzipitationshemmungsreaktionen durchgeführt. Wir haben 25 Stoffe, darunter einfache Ester der p-Aminobenzoesäure, die in der Seitenkette aminierten Ester derselben, verschiedene Derivate der Benzoesäure und der Oxybenzoesäure, ferner benzoesäurefreie Lokalanästhetika, p-Aminobenzoesäure, p-Aminobenzolsulfamid und Anilin, von dem Gesichtspunkt aus geprüft, ob sie die Präzipitation zwischen den Novocainazoprotein-Antikörpern und dem homologen Antigen hemmen oder nicht. — Von den sich als hemmend erwiesenen Stoffen wurden die kleinsten Mengen durch entsprechende Verdünnungsreihen bestimmt, welche unter den sonst konstanten Bedingungen des Versuches eine komplette Hemmung bewirken. Die Ergebnisse sind in Tab II. zusammengefasst.

Wie aus den Daten der Tabelle ersichtlich, entfällt die Präzipitation zwischen den Novocainazoprotein-Immunkörpern und dem Antigen nach vorangehendem Zusatz von einfachen Alkyl-Estern der p-Aminobenzoesäure — wie das Anästhesin, Normopropyl- und Normobutylester-, bzw. von Monocain, Tutocain, Larocain, Butyn, Panthesin und selbstredend Novocain selbst, wogegen die übrigen untersuchten Stoffe keinerlei Einfluss auf die Antigen-Antikörper-Reaktion ausübten. Auch diese Versuche beweisen, dass die Novocainazoproteine sich wie chemospezifische Antigene verhalten, wobei das aktive Radikal im Molekül als Hapten wirkt. Nach gründlicherem Studium der Strukturformel der hemmenden Stoffe ist auf die Möglichkeit Bedacht zu nehmen, dass in der Determinierung der Chemospezifität die zur veresterten Carboxylgruppe in p-Stellung befindliche Aminogruppe eine Rolle spielt. Aus den Daten der Tabelle kann man weiterhin entnehmen, dass dem für die Chemospezifität verantwortlichen Novocain am nächsten verwandt das Monocain und Tutocain sind, denen der Reihe nach das Larocain, Butyn und Panthesin folgen. Das Molekulargewicht der an die Carboxylgruppe geknüpften aminhältigen Seitenkette und die Stärke der Hemmungswirkung sind umgekehrt proportional. Die hemmenden einfachen Ester der p-Aminobenzoesäure sind dem Novocain auf Grund der Präzipitationshemmung etwa gleich nahe verwandt wie das Panthesin.

III.

Im zweiten Teil unserer Arbeit haben wir uns bemüht, die auch praktisch nicht unbedeutende Frage zu klären, wie weit die Immunisierung mit Novocainazoproteinen und die Produktion chemospezifischer Immunkörper die bekannten

TABELLE II

0,5 cm³ 0,01%-ige Novocainazoprotein-Lösung + 0,1 cm³ von 1/100 mol. Lösungen der auf Hemmungseffekt untersuchten Substanzen

| Novocainazoprotein-Immunsera (Nr der Kaninchen) | Die auf Präzipitationshemmungseffekt untersuchten Substanzen | | |

Wirkungen des Novocains (wie seine Wirkung auf die Wärmeregulation, seine anästhetische Wirksamkeit, Toxizität) beeinflussen.

Zur Untersuchung der Novocainwirkung auf die Wärmeregulation wurden nach *Glaubach* und *Pick* (17) männliche Meerschweinchen verwendet. 10 Tiere erhielten je 200 mg/kg Novocain subkutan, wonach die rektale Temperatur in 30 Min. Intervallen (die Tiere bei einer Zimmertemperatur von 20° C haltend) kontrolliert wurde. Alle wiesen einen Temperaturabfall auf, dessen Maximum von 1,5—2,5° C etwa 1 Stunde nach der Injektion und die Rückkehr zur Normaltemperatur nach etwa 4 Stunden erreicht wurde. Dieselben Tiere wurden dann mit Novocain-Pferdeserum-Azoprotein intraperitoneal immunisiert; binnen 18 Tagen erhielten sie je 25 ml Lösung in 5 ansteigenden Dosen. 8—18 Tage nach der letzten Injektion wurde — wie zuvor — die temperaturherabsetzende Wirkung von 200 mg/kg Novocain bestimmt. An allen immunisierten Tieren war ein gleich tiefer und gleich lange anhaltender Abfall der Temperatur nachzuweisen, wie vor der Immunisierung.

Da die Menge der Immunkörper bei den Meerschweinchen auf Grund der Präzipitationsreaktionen wesentlich kleiner war als bei den Kaninchen (im allgemeinen waren Titerwerte von 1 : 200, nur bei einem Tier ein Präzipitationstiter von 1 : 400 zu finden), hielten wir es für notwendig den Zusammenhang zwischen den Novocainazoprotein-Antikörpern und der Temperaturwirkung des Novocains an Kaninchensera von höherem Titerwert nachzuprüfen. Zehn Meerschweinchenmännchen erhielten je 200 mg/kg Novocain subkutan in 3 ml normalem Kaninchenserum. Das Serum-Novocain-Gemisch wurde vorher bei 37° C 15 Min. lang inkubiert. Alle Tiere wiesen einen Temperaturabfall — mit dem Maximum von 1,5—2,5° C nach 1 Stunde und eine Rückkehr zur Normaltemperatur nach 4 Stunden auf. Nach 4 Tagen erhielten dieselben 10 Tiere je 200 mg/kg Novocain subkutan in je 3 ml Novocainazoprotein-Antiserum von Kaninchen (Serum No. 8. Titer 1 : 3200) nach vorangehender Inkubation bei 37° C durch 15 Min. Das mit Immunserum inkubierte Novocain löste einen gleich starken und gleich lange anhaltenden Abfall der Temperatur aus, wie das mit Normalserum inkubierte.

Auf Grund obiger Versuche können wir also feststellen, dass die aktive Immunisierung mit Novocainazoprotein die Temperaturwirkung des Novocains am Meerschweinchen nicht beeinflusst. Die passive Übertragung der präzipitierenden Antikörper war ebenso wirkungslos.

Wir haben weiterhin mit der Methodik von *Gros* (18) geprüft wie verschiedene Novocainkonzentrationen — mit Normalserum und Novocainazoprotein-Immunserum von Kaninchen bei 37° C 15 Min. lang inkubiert — das Auftreten der Novocainblockade der Erregungsleitung in Nerven beeinflussen. Das Muskel-Nerv-Präparat des Frosches wurde durch Einzelentladungen eines Kondensators gereizt. Die Blockade der Leitung gilt dann als eingetreten, wenn bei 100 V Füllung des 2 MF Kondensators das Präparat weder auf einzelne, noch

auf rhytmische Reizungen reagierte. Die einschlägigen Ergebnisse sindin Tab. III zusammengefasst, wobei wir jeweils den Mittelwert von in je 5 Einzelversuchen ermittelten Zeitwerten anführen.

TABELLE III

Novocain %	Eintritt der Leitungsblockade bei Gegenwart von	
	Normalserum	Immunserum
0,25	20'	28'
0,5	12'	16'
1	10'	12'
2	6'	6'
3	4'	3'

Wie aus der Tabelle ersichtlich, wird der Eintritt der Leitungsblockade durch höhere Konzentrationen des Novocains durch das Immunserum überhaupt nicht beeinflusst. Bei der 0,25 und 0,5% Novocainlösung scheint eine gewisse Beeinflussung vorzuliegen, doch sind die Abweichungen unterhalb der Grenze der statistischen Signifikanz.

Bezüglich der Leitungsanästhesie mit Novocain haben wir die Wirkung hochwertiger Novocainazoprotein-Immunsera mit Hilfe der von *van Leeuwen* und *Verzár* (19) empfohlenen Methode an dezerebrierten Katzen zu prüfen versucht. Die theoretisch nicht entsprechend begründete Methode erwies sich auch in der Praxis als undurchführbar. Aus diesem Grunde haben wir zur Feststellung der quantitativen Verhältnisse der Leitungsanästhesie mit Novocain ein neues Verfahren ausgearbeitet.

Das Wesen desselben ist: In Chloralose-Narkose präpariert man beidseitig den N. peronaeus comm. des Hundes un 5—6 cm Länge frei; man durchschneidet den Nervenstamm und reizt den zentralen Stumpf durch supermaximale Kondensatorentladungen von 100/sec. Frequenz durch je 10 Sekunden in Intervallen von 3 Minuten. Zwischendurch wird der Blutdruck in der Carotis registriert. Wie aus Abb. 1 ersichtlich, löst die Reizung des zentralen Stumpfes den sog. *Lovén*-Reflex (20) aus; der Carotisblutdruck steigt reflektorisch an, da die Reizung eines sensiblen Extremitätennervs in der versorgten Extremität eine Vasodilatation, im übrigen Stromgebiet eine Vasokonstriktion bewirkt. Nacher wird der linke N. peronaeus comm. in ein Gefäss gelegt, welches ein Gemisch von 1% Novocain und Kaninchen-Normalserum (zuvor 15 Min. lang bei 37° C inkubiert) enthält: der Nerv wird peripher von diesem Gefäss gereizt.

Wie aus der Abb. klar ersichtlich, wird die reflektorische Blutdruckerhöhung — in dem Masse, wie die Leitungsanästhesie sich einstellt — immer

geringer und zum Schluss entfällt der Reflex gänzlich. Dass hierfür die Leitungsunterbrechung durch das Novocain veranwortlich ist, lässt sich durch Reizung des Nerven zentral von der Blockadestelle beweisen, die in jedem Fall zu einem reflektorischen Blutdruckanstieg führt. Auf der Gegenseite wird der Nerv in ein Gemisch von 1% Novocain und hochtiterigem Novocainazoprotein-Kaninchenimmunserum getaucht, welches zuvor 15 Min. lang bei 37° C inkubiert wurde. Die Reizungen wurden auf die gleiche Art durchgeführt wie auf der Gegenseite. In Versuchen an 5 Hunden kamen wir zum Feststellung, dass das Immunserum keinerlei verzögernde oder hemmende Wirkung auf den Eintritt der Nervenblockade (Leitungsunterbrechung) ausübt.

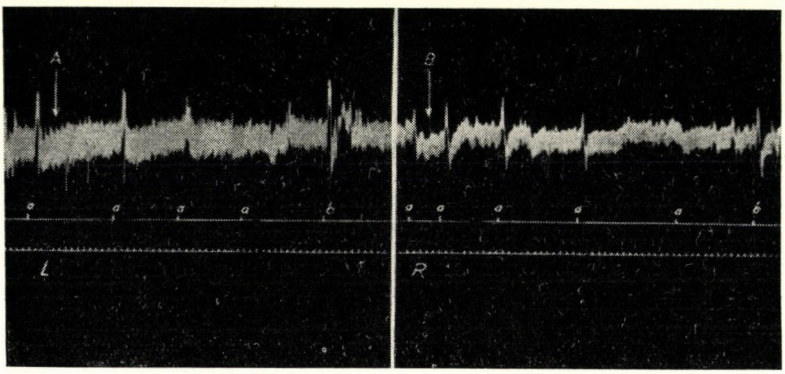


Abb. 1. L = Versuch am linken N. peronaeus; R = Versuch am rechten N. peronaeus; A = 1%-ige Novocainlösung in 3 ccm Normalserum; B = 1%-ige Novocainlösung in 3 ccm Immunserum; a = Reizung des N. peronaeus peripher vom novocainisierten Teile; b = Reizung des N. peronaeus zentral von der novocainisierten Stelle (Reizdauer: 10")

Die zuvor beschriebenen Versuche deuten einhellig darauf hin, dass die im Immunserum vorhandenen serologisch nachweisbaren Antikörper auf den Temperatureffekt des Novocains, sowie auf die Blockade der motorischen und sensiblen Leitungen in Nerven durch das Novocain wirkungslos sind. Es gelang uns also nicht, beim Versuchstier durch systematische Behandlung mit an Protein gebundenem Novocain die Bildung derartiger Antikörper anzuregen, welche die nervenlähmende Wirkung des Novocains neutralisiert hätten. Dieser unser Befund deutet darauf hin, dass eine Novocainimmunität oder-resistenz am Menschen durch die seltenere und weniger systematische Darreichung des Novocainhydrochlorids wohl niemals entstehen dürfte, da dieses erst im Organismus an das Protein gebunden werden müsste, was wohl zumeist weniger vollkommen und im geringeren Masse vor sich geht als in vitro. Wir glauben also die Meinung verwerfen zu müssen, welche den gelegentlich immer wieder vorkommenden Misserfolg einer Leitungsanästhesie mit Novocain einer Immuni-

sierung durch vorangehende gleichartige Injektionen (durch intravitale Bildung eines Novocainproteinkomplexes) zuschreibt. Der Grund des Misserfolges ist eher in einer anatomisch nicht einwandfreien Technik der Leitungsanästhesie zu suchen. Bezeichnenderweise sind Misserfolge nach terminaler Infiltration wesentlich seltener.

Anders sind aber unsere Erfahrungen, was die Wirkung der Novocainazoprotein-Immunkörper auf die Dosis lethalis minima des Novocains anbetrifft. Wir haben verschiedene Mengen von Novocain in Kaninchennormalserum gelöst, bei 37° C 15 Min. lang inkubiert und 900—1100 g schweren Jungkaninchen intravenös injiziert. Übereinstimmend mit den Daten der Literatur (21) haben wir auf Grund von Versuchen an 30—30 Tieren festgestellt, dass 60 mg/kg Novocain nach der beschriebenen Vorbehandlung (Inkubation) die Tiere binnen 2 Min. sicher tötet. Die gleiche Menge Novocain — mit 2 ml Immunserum auf die gleiche Art inkubiert — bewirkt nur leichtere Intoxikationserscheinungen, welche binnen 15—30 Min. zu Ende laufen, ohne den Tod auch eines einzigen Tieres bewirkt zu haben. Die Ergebnisse sind in Tab. IV. zusammengefasst. Wie aus den Daten der Tabelle ersichtlich, bewirkte 70 mg/kg Novocain nach vorangehender Inkubation mit dem Immunserum in keinem Fall den Tod des Versuchstieres. Mit Immunserum inkubiert beträgt die tödliche Novocaindosis 80 mg/kg, die tödliche Wirkung dieser Menge war aber durch eine weitere Erhöhung des Immunserumzusatzes nicht mehr abzuwehren.

TABELLE IV

Novocain mg/kg	Serummenge ccm	Novocain + Normalserum			Novocain + Immunserum		
		Zahl			Zahl		
		der Versuchs-kaninchen	der überlebenden Tiere	der verlorenen Tiere	der Versuchs-kaninchen	der überlebenden Tiere	der verlorenen Tiere
40	1,0	2	2	—	—	—	—
50	1,0	3	2	1	—	—	—
	2,0	3	3	—	—	—	—
	3,0	3	3	—	—	—	—
60	2,0	5	—	5	6	6	—
	3,0	5	—	5	6	6	—
70	2,0	—	—	—	6	6	—
	3,0	3	—	3	3	3	—
	4,0	3	—	3	—	—	—
80	2,0	—	—	—	3	—	3
	3,0	—	—	—	2	—	2
	4,0	—	—	—	4	—	4
	5,0	3	—	3	—	—	—

Während also die Novocainazoprotein-Immunkörper die nervenlähmende und Temperatur-Wirkung des Novocains überhaupt nicht beeinflussen, gewähren sie einen gewissen, aber eindeutigen Schutz gegen die normalerweise tödliche Dosis. Diese Feststellung scheint uns auch theoretisch wichtig. Auf Grund der Präzipitationshemmung sind wir ohne Zweifel zur Folgerung berechtigt, dass zwischen dem Novocain und den Antikörpern eine Bindung zustandekommt. Wir haben keinen wie immer gearteten Grund zur Annahme, dass diese Bindung während der Inkubation des Novocains mit dem Immunserum zwischen Hapten und Antikörpern nicht erfolgen würde. Da aber das inkubierte Gemisch auf die Nervenleitung und Temperatur so wirkt, als ob sie die volle Menge Novocain im aktiven Zustand enthielte, die lethale Dosis hinwieder durch teilweise Inaktivierung des Novocains eine Erhöhung erfährt, ist zur Erklärung dieses zweifachen Verhaltens die Annahme nicht unberechtigt, dass im Komplex, der anlässlich der Antikörper-Hapten-Reaktion entsteht, die anästhesierenden und temperaturherabsetzenden Gruppen im Molekül frei und intakt geblieben sind, während die tödlich wirkenden eine Inaktivierung oder Abbindung erfuhren. Diese Erklärung scheint dafür zu sprechen, dass die anästhesierenden und temperaturherabsetzenden Radikale im Novocainmolekül nicht mit den für die tödliche Vergiftung verantwortlichen Atomgruppen identisch sein dürften. Auf Grund der serologischen Versuche kann man mit grosser Wahrscheinlichkeit annehmen dass die Letzterwähnten nahe der für die Chemospezifität verantwortlichen Gruppe, d. h. der Aminogruppe stehen, die am Benzolkern in p-Lage zur veresterten Carboxylgruppe steht.

IV.

Die klinische Bedeutung einer Überempfindlichkeit gegen örtliche Betäubungsmittel, vorwiegend gegen das Novocain, steht heute — nach anfänglichen Kontroversen in der Literatur — ausser Zweifel. Die Allergie gegen Lokalanästhetika ist in zweierlei Beziehung von praktisch grosser Wichtigkeit: einerseits für den Arzt und z. T. für das Pflegepersonal durch den häufigen Kontakt mit örtlichen Betäubungsmitteln, anderseits für den Patienten infolge einer einmal zufällig erworbenen Allergie anlässlich der nächsten Darreichung insbesondere von grösseren Mengen von Novocain, welche hauptsächlich als Ergebnis einschlägiger Arbeiten sowjetischer Forscher in neuerer Zeit ein immer ausgedehnteres therapeutisches Gebiet errungen zu haben scheint (22).

Die grösstenteils von Zahnärzten stammenden Erstberichte über Novocaindermatitis stammen aus einer Zeit etwa 15 Jahre nach Einführung des Novocains (23). Zunächst wurde darüber diskutiert, ob das Ekzem und die Dermatitis durch das Novocain oder sonstige Kontaktschäden ausgelöst werden, wobei man sich vergeblich bemüht hat, durch wiederholte subkutane Novocaingaben

eine Allergie am Menschen künstlich zu erzeugen (24). Danach konnte am Menschen sowohl die passive Übertragbarkeit der Überempfindlichkeit erwiesen (25), als auch eine lokale Allergie der Haut gegen bestimmte örtliche Betäubungsmittel durch entsprechende zusätzliche Massnahmen künstlich erzeugt werden (26).

Nach dem ersten Weltkrieg begann die Einführung der höheren Homologe der Novocainreihe in die Therapie und bei der Empfehlung eines jeden neuen örtlichen Betäubungsmittels schöpfte der Arzt, den der lästige Ausschlag an den Händen vorübergehend (mitunter aber auch für längere Zeit) berufsunfähig gemacht hat, neue Hoffnungen. In der Folgezeit wurde von *Goodman* (27), *Simon* und *Adler* (28), *Laden* und *Wallace* (29) an novocainallergischen Personen empirisch geklärt, dass die allergische Überempfindlichkeit nur gegen *eine einzige Gruppe* von örtlichen Betäubungsmitteln gerichtet ist, u. zw. in allen von den genannten Autoren untersuchten Fällen gegen die Abkömmlinge der p-Aminobenzoesäure. Manche klinische Erfahrungen waren indessen widersprechend, da z. B. *Strauss* (30) eine kutane Überempfindlichkeit gegen Novocain und Apothesin gefunden hat, wogegen der Patient gegen Pantocain, ein anderes Derivat der p-Aminobenzoesäure, nicht überempfindlich war.

Die Frage der Gruppenspezifität in der Allergie gegen Lokalanästhetika konnte mit Hilfe der vorhin besprochenen Präzipitationsversuche in aller Eindeutigkeit geklärt werden (vgl. Tabelle 2). Es darf in diesem Zusammenhang aber nicht unerwähnt bleiben, dass zwischen den Ergebnissen der Präzipitationshemmungsreaktionen und unseren klinischen Erfahrungen eine Diskrepanz besteht, da das Pantocain die Präzipitation des Novocainazoproteins durch das Antiserum in vitro nicht hemmt, am novocainallergischen Menschen hingegen in vivo eine kutane Reaktion auszulösen vermag. In diesem Zusammenhang sei nochmals die bereits erwähnte klinische Beobachtung von *Strauss* (30) in Erinnerung gerufen. Im allgemeinen ist aber der Mensch ein wenig geeignetes Objekt, um die Gruppenspezifität einer Allergie genauer zu studieren, da diese am Menschen die Tendenz der Schwankung, vor allem aber der Ausbreitung — in Form von Par- und Metallergien — besitzt, so dass der Allergiker zum Schluss auch auf solche Antigene reagiert, welche sich vom sensibilisierenden Allergen nicht unwesentlich unterscheiden. Der gleiche Prozess dürfte übrigens auch dafür verantwortlich sein, dass ein Mensch mitunter bereits anlässlich des Erstkontaktes mit Novocain allergische Erscheinungen aufweist. So konnte u. a. *G. Rajka* (31) an Arbeitern chemischer Betriebe, die nicht mit Novocain zu arbeiten hatten, anlässlich der systematischen Erforschung der Kutanempfindlichkeit gegen verschiedene Chemikalien eine solche gegen Novocain nachweisen. Aus all diesen Gründen schien die tierexperimentelle Klärung der Gruppenspezifität der Allergie gegen Lokalanästhetika überaus notwendig zu sein.

Auf Grund der klinischen Erfahrungen und der vorangehend besprochenen Tierversuche ist für novocainallergische Personen, vor allem für den novocainallergischen Zahnarzt, der ja unter allen Fachärzten weitaus am häufigsten mit

Novocain zu tun hat und noch dazu immer mit unbehandschuhter Hand arbeitet, *die Anwendung von örtlichen Betäubungsmitteln, die frei von p-Aminobenzoesäure sind, unbedenklich.* Uns ist es weder aus persönlicher Erfahrung, noch aus der Literatur bekannt, dass je ein Arzt oder Patient sich gefunden hatte, der gegen alle Lokalanästhetika überempfindlich gewesen wäre. Die beste Methode gegen die Novocainallergie ist sicherlich die Vorbeugung: so empfehlen wir nach Eintritt der ersten Zeichen einer solchen Allergie, die Arbeit mit Novocain und sonstigen Derivaten der p-Aminobenzoesäure einzustellen und örtliche Betäubungsmittel anderer chemischer Struktur zu verwenden, von denen wir auf Grund eigener klinischer Erfahrungen das Xylocain und Nupercain hervorheben möchten. In diesem Zusammenhange ist noch zu erwähnen der 2-Isobutylamino-



Abb. 2. Positive Kutanreaktion auf Novocain

äthylester der m-Aminobenzoesäure (Unacaine), der sich vom klinisch bestbewährten Monocaine lediglich darin unterscheidet, dass am Benzolkern die Amino- und Carboxylgruppen im Monocaine sich in p-, im Unacaine hingegen in m-Stellung befinden. Nach *McDonald* (32) ist die therapeutische Breite des Unacaine günstiger als die des Monocaine. Auch nach unseren einstweilen beschränkten klinischen Erfahrungen bedeutet die Einführung dieses neuen Isomers einen Fortschritt auf dem Gebiete der örtlichen Betäubung, der unmittelbar durch die Erstpublikation unserer einschlägigen experimentellen Erfahrungen ausgelöst wurde. Anknüpfend an *McDonald*'s Befunde muss auch die Möglichkeit in Erwägung gezogen werden, dass die p-Aminobenzoesäure seit *Einhorn* nur deshalb zum Ausgangsmaterial der löslichen örtlichen Betäubungsmittel herangezogen wurde, weil es von allen Stereoisomeren am leichtesten zu erhalten war.

Wir haben fernerhin auch versucht, die therapeutische Anwendbarkeit des Novocainazoprotein-Immunserums zur Beeinflussung der allergischen Eruptionen durch Novocain zu prüfen. Das gleiche Volumen eines hochtiterigen Immunserums (1 : 20 000) mit 0,004% Novocainlösung durch 15 Min. bei 37° C inkubiert,

neutralisiert das Allergen so weit, dass es bei intrakutaner Einspritzung keine papulöse Eruption mehr hervorruft und auch die Flächenausdehnung des Erythems an der Injektionstelle nicht grösser ist als bei der alleinigen Injektion des Immunserums. Wird ein ähnliches Gemisch ohne vorangehende Inkubation intrakutan eingespritzt — so löst es noch immer kein papulöses Exanthem, aber immerhin ein doppelt so stark ausgedehntes Erythem aus. Bei zehnfach grösserer Konzentration des Novocains, ja selbst bei der Verwendung einer 0,4% Novocainlösung war die Inkubation mit dem gleichen Immunserumvolumen in dem Sinne deutlich wirksam, dass das Gemisch eine wesentlich geringere papulöse und erythematöse Reaktion ausgelöst hatte, als ein Gemisch aus den gleichen Bestandteilen ohne Inkubation oder gar Novocain mit Normalserum gemischt oder für sich allein. Ebenso gelang es uns, die Eruptionen durch Umspritzen mit Immunserum zu mitigieren. Die nachträgliche Injektion von Novocain in ein mit Immunserum inbibiertes Gebiet löste ebenfalls nur eine mitigierte Reaktion aus. Die quantitativen Verhältnisse dieser passiven Immunisierungsversuche sind indessen — selbst bei der Verwendung eines Serums 1 : 20 000 Titer, ein ausserordentlich hoher Titerwert für ein künstliches Antigen! — derart, dass diese Methode zur klinischen Behandlung der Novocainallergie und ihrer Folgezustände nur im höchst beschränkten Masse in Frage kommen durfte.

Auf Grund klinischer Erfahrungen und Tierversuche glauben wir im Interesse der Patienten die Meinung vertreten zu müssen, dass man *vor der therapeutischen Injektion* von grösseren Novocainmengen die Allergie gegen dieses örtliche Betäubungsmittel am Patienten selbst prüfen müsse. Hierzu ist — abgesehen von in Lokalanästhesie durchzuführenden dringenden oder kleinen ambulanten Eingriffen — immer Zeit genug vorhanden, erst recht vor der Einleitung der Novocaintherapie der verschiedenen Krankheitsbilder. Die Ergebnisse der Kutanprobe (Abb. 2.) sind innerhalb 24 Stunden ablesbar. Wie oben bereits ausgeführt, sind im Falle einer Allergie gegen Novocain andere örtliche Betäubungsmittel anzuwenden, die nicht aus der p-Aminobenzoesäure-Reihe stammen.

Zusammenfassung

Die Herstellung eines Novocain-Eiweisskomplexes erfolgte durch das Diazoniumsalz des Wirkstoffes, welche mittels der Paulyschen Reaktion mit Rinder- und Pferdeserumeiweiss gekuppelt wurde. Die Immunisierungsversuche mittels dieser Novocainazoproteine wiesen darauf hin, dass sich die Eiweisskomplexe des Novocains als chemospezifische Antigene verhalten in dem Sinne, dass die Spezifität der entstandenen Antikörper durch die Novocaingruppe des injizierten Azoproteins bestimmt wird. Es ist auf Grund der Landsteinerschen Präzipitationshemmungsreaktionen mit verschiedenen Derivaten der p-Amino-

benzoesäure und mit örtlichen Betäubungsmittel anderer chemischer Struktur zu vermuten, dass in der Determinierung der Chemospezifität die zur veresterten Carboxylgruppe in p-Stellung befindliche Aminogruppe eine Rolle spielt, weiters, dass der chemospezifitätbestimmenden Novocaingruppe serologisch am nächsten verwandt das Monocaine und Tutocain sind, denen der Reihe nach das Larocain Butyn und Panthesin folgen.

Durch aktive Immunisierung mit Novocainazoprotein und durch passive Übertragung der präzipitierenden Antikörper wird die Temperaturwirkung des Novocains am Meerschweinchen nicht beeinflusst. Auf die Novocainblockade der motorischen und sensiblen Leitung im Nerv erwiesen sich die Novocainazoprotein-Immunsera ebenfalls wirkungslos. Dagegen bewirkte die unter normalen Verhältnissen für die Kaninchen tödliche Novocaindosis (60 mg/kg) nach vorangehender Inkubation mit Immunserum in keinem Fall den Tod des Versuchstieres. Mit Immunserum inkubiert, beträgt die tödliche Novocaindosis 80 mg/kg ; die tödliche Wirkung dieser Menge war aber durch eine weitere Erhöhung des Immunserumzusatzes nicht mehr abzuwehren.

Es wurde auf Grund klinischer Erfahrungen und der mitgeteilten Präzipitationsversuche das Problem der Überempfindlichkeit gegen örtliche Betäubungsmittel und die serologische Strukturspezifität der Lokalanästhetika besprochen. Bei durch Novocain verursachten allergischen Eruptionen, ein gleiches Volumen von einem hochwertigen, mit 0,004% Novocainlösung durch 15 Min. bei 37° C inkubierten Immunserum neutralisiert das Allergen so weit, dass es bei intrakutaner Einspritzung keine papulöse Eruption mehr hervorruft und auch die Flächenausdehnung der Erythems an der Injektionstelle nicht grösser wird als bei der alleinigen Injektion des Immunserums. Ebenso gelang es die Eruptionen durch Umspritzen mit Imunserum zu mässigen.

LITERATUR

1. *Clutton, R. F., Harington, C. R.* und *Yuill, M. E.:* Biochem. J. **32**, 1, 1119, (1938).

2. *Went, St., Kesztyűs, L.* und *Piribauer, K.:* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. **193**, 312, (1939) ; **195**, 721, (1940).

3. *Fell, N., Rodney, G.* und *Marshall, D. E.:* J. Immunol. (Am.) **47**, 237, (1943) ; *Rodney, G.* und *Fell, N.:* J. Immunol. **47**, 251, (1943).

4. *Went, St.* und *Kesztyűs, L.:* Orvosok Lapja, 257, (1946). Schweiz. Med. Wschr. 1276, (1948). Proceedings of the Fourth International Congress for Microbiology, Copenhague 1947. *Went, St.:* Orvosi Hetilap, 613, (1949). *Kesztyűs, L.:* Orvosi Hetilap 617, (1949).

5. *Went, St.* und *Kesztyűs, L.:* Acta Med. Hung. **2**, 1. H. (1951).

6. *Rajka, Ö.:* Acta Med. Hung. **2**, 1. H. (1951).

7. *Hajós, K.* und *Hajós, M.:* Orvosi Hetilap 1001. (1950). *Hajós, K.:* Orvosi Hetilap 1563, (1951).

8. *Petrányi, Gy.:* Orvosi Hetilap 171, (1952).

9. *Went, St.* und *Kesztyűs, L.:* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. **193**, 609, (1939). *Went, St.:* Klin. Wschr. 470, (1942).

10. *Kesztyűs, L.* und *Went, St.:* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. **198**, 338 (1941).

11. *Went, St., Kesztyűs, L.* und *Szilágyi T.:* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. **202**, 143, (1943).

12. *Buttler, C. G., Harington, C. R.* und *Yuill, M. E.:* Biochem. J. **34**, 838, (1940).
13. *Hooker, S. B.* und *Boyd, C. W.:* J. Immunol. **38**, 479, (1940).
14. *Berger, E.* und *Erlenmeyer, H.:* Gior. Batt. Immunol. **13**, 412, (1934).
15. *Mooser, H.* und *Grilliches, R. K.:* Schweiz. Zschr. f. Path. u. Bakt. **4**, 375, (1941).
16. *Gardner, J. H.* und *Joseph, L.:* J. Amer. Chem. Soc. **57**, 901, (1935).
17. *Glaubach, S.* und *Pick, E. P.:* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. **151**, 341, (1930); **162**, 537, 551, (1931).
18. *Gros, O.:* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. **62**, 380, (1910).
19. *Van Leeuwen, S.* und *Verzár, F.:* Abderhaldens Handb. Abt. IV. Teil 7 B 1068, (1935).
20. *Lovén, C.:* Ber. d. math.-naturwiss. Klasse d. k. Gesellsch. Wissensch. (Leipzig). **18**, 85, (1866).
21. *Flury, F.* und *Zernik, F.:* Abderhaldens Handb. Abt. IV. Teil 7 B. 1376, (1935).
22. *Adler, P.* und *Uri, J.:* Zahnärztliche Lokalanästhesie, usw. C. Hanser, München, 1952.
23. *Lane, C. G.:* Arch. Dermat. & Syph. **3**, 235, (1921).
24. *Silber, D.:* Dtsch. Monschr. Zahnhlk. **46**, 339, (1928).
25. *Adler, P.* und *Simon, M.:* Oral Surg. etc. **2**, 1029, (1949).
26. *Schwarzschild, L.:* Arch. Dermat. u. Syph. **156**, 432, (1928).
27. *Goodman, M. H.:* J. Invest. Dermat. **2**, 53, (1939).
28. *Simon, M.* und *Adler, P.:* Dermatologica **98**, 157, (1949).
29. *Laden, E. L.* und *Wallace, D. A.:* J. Invest. Dermat. **12**, 299, (1949).
30. *Strauss, J. M.:* J. Invest. Dermat. **8**, 403, (1947).
31. *Rajka, Gy.:* Orvosi Hetilap **91**, 1459, (1950).
32. *McDonald, D. H.:* Items of int. **73**, No 11, (1951).

НОВОКАИНАЗОПРОТЕИН И АЛЛЕРГИЯ НОВОКАИНА

П. Адлер, Т. Баньяс, Т. Явор, Л. Кестъюш, М. Шимон, Т. Силадьи, Е. Варга и С. Вент

Физиологический и патофизиологический институт, Стоматологическая и дерматологическая клиника медицинского университета, г. Дебрецен

Резюме

Изготовление новокаин-белкового комплекса состоялось при помощи соли диазония биологически активного вещества, которая соединялась реакцией Паули с белком сывороткой рогатого скота и лошадей. Иммунизационные опыты с этими новокаиназопротеинами указывали на то, что белковые комплексы новокаина имеют свойства хемоспецифических противотел, т. е. специфичность возникших антител определяется группой новокаина впрыскиванного азопротеина. На основании тормозящей реакции преципитации по Ландштейнеру с различными производными р-аминобензойной кислоты, и с средствами локального наркоза других химических структур, следует предполагать, что в определении хемоспецифичности играет роль группа аминов, находящаяся в р-положении к эстерификационной группе карбоксила, далее, что группе новокаина, определяющей хемоспецифичность, серологически родственнее всего монокаин и тутокаин, которым по очереди следуют ларокаин, бутин и пантесин.

Активная иммунизация новокаиназопротеином и пассивное заражение преципитирующих антител не влияют на тепловой эффект новокаина у морской свинки. Иммунные сыворотки новокаиназопротеина также не имели действия на новокаиновую блокаду моторного и чувствительного нервного проведения. В противоположность этому, доза новокаина (60 мг/кг), являющаяся при нормальных условиях смертельной для кроликов, после предшествующей инкубации иммунной сывороткой, ни в одном случае не вызвала смерть подопытного животного. Предварительно проведя инкубацию иммунной сывороткой, смертельная доза новокаина определяется в 80 мг/кг; смертельное действие этой дозы невозможно было предотвратить даже большим количеством иммунной сыворотки.

На основании клинического опыта и сообщенных преципитационных экспери ментов был обсужден вопрос сверхчувствительности в отношении наркотических средств местного влияния, а также и серологическая специфичность структуры локальных анестезинов. В случае вызванной новокаином аллергической сыпи, равный объём высококачественной иммунной сыворотки с 0,004% раствором новокаина, при инкубации в течение 15 минут на 37° С, нейтрализирует этот аллерген до такой степени, что он при внутрикожном впрыскивании уже больше не вызывает папулезный сыпь, а также и распространение эритемы на месте инъекции не больше, чем при единичном впрыскивании иммунной сыворотки. Точно так же удалось сократить объем сыпей впрыскиванием вокруг них иммунной сыворотки.

GENITALE VERÄNDERUNGEN AN MÄNNLICHEN RATTEN VERURSACHT DURCH PARTIELLEN METHIONINMANGEL

Von

J. SÓS, T. KEMÉNY und M. SCHNELL

PATHOPHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen: am 20. August, 1952)

Die aus Mangelschaden erfolgenden pathologischen Veränderungen des männlichen Sexualapparates sind in ihren Einzelheiten noch nicht bekannt. Wie von *Selye* dargelegt wird, ist der Hoden gegenüber den qualitativen und quantitativen Veränderungen der Nahrung äusserts empfindlich. Chronischer Mangelschaden führt sowohl in dem System der spermiogenetischen *Sertoli*'schen, als in demjenigen der endokrinen *Leydig*'schen Zellen eine Atrophie herbei. Die Involution der Hoden wurde nicht nur an Versuchstieren, sondern auch an mangelhaft ernährten Männern beobachtet. Der pathologische Prozess wird von *Selye* für eine Teilerscheinung des Stress gehalten.

Die Entstehung der durch Mangelschaden verursachten sexuellen Veränderungen lässt sich auf zwei indirekten Wegen verfolgen. *Selye*, *Bennett*, *Baggenstoss*, *Adams*, *Alvizouri*, *Martin* (12, 3, 1, 2, 10) usw. berichten, dass die degenerativen Veränderungen der Leber mit einer Schädigung der Hoden einhergehen und dass die fettige Entartung der Leber gleichfalls eine Teilerscheinung der Mangelkrank-heiten ist.

Andere Forscher berichten über den sich mit den Anämien parallel entwickelnden Priapismus. Auch die Anämie ist bereits eine Teilerscheinung des Mangelzustandes und so gelangen wir indirekt wieder zu dem Zusammenhang zwischen Mangelkrankheiten und Schädigung der Sexualorgane. Die Frage bedarf jedoch einer Klärung durch direkte Untersuchung des Zusammenhanges und es wurden daher zu diesem Zwecke Versuche durchgeführt.

Versuche

Die Versuche wurden an 204 männlichen geschlechtereifen Albinoratten durchgeführt. Die Tiere wurden in drei Hauptgruppen geteilt; 1. praktisch totaler Methioninmangel, 2. normale Kontrolle, 3. partieller Methioninmangel. Die Hauptgruppen wurden in Untergruppen geteilt. Die normale Kontrollgruppe erhielt in zwei Untergruppen zweierlei Nahrung und zwar einesteils eine caseinhaltige optimale Kost, andernteils eine Diät, die aus methioninfreien

Bestandteilen mit Hinzufügung von Methionin zusammengestellt wurde. Die partielle Mangeldiät hatte verschiedene Grade und wurde in verschiedener Weise zusammengestellt. Die angewandte Diät war die folgende :

1. Totaler Methioninmangel (4H) ; 15% Leim, 3% Hefemehl, 10% Fett, 1% Lebertran, 4% Salzmischung nach *Sós*, 67% Stärke und Vitaminergänzung. Das Futter enthielt pro 100 gr nur 33 mg Methionin, was bloss 6% des Bedürfnisses beträgt und auf Grund vorangegangener Versuche einem totalen Methioninmangel entspricht.

2. *a)* Normale Kontrolldiät ; 10% Casein, 6% Fleischmehl, 3% Hefemehl als Eiweissquellen, ansonsten wie oben. Methioningehalt pro 100 gr Futter 549 mg.

2. *b)* Komplettierte Kontrolldiät ; Mit Methionin voll ergänzte Kost (120. M.). Zu der mit 4H bezeichneten Mangeldiät wurde 1% dl-Methionin gemischt. Die Diät enthielt somit pro 100 gr 1033 mg Methionin, also mehr als das optimale Bedürfnis.

3. *a)* Partielle Mangeldiät ; Zu der mit 4H bezeichneten, unter 1. angeführten Diät wurden pro Tag und pro Versuchstier 2 mg, durchschnittlich 20 mg Methionin pro 100 gr Futter gemischt.

3. *b)* Partielle Mangeldiät, bestehend aus Grunddiät 4H und pro 100 gr Futter 50 mg Methionin, wodurch die Kost 8 mg Gesamt-Methionin enthielt, was somit 21% des Bedürfnisses entspricht.

3. *c)* Ein weiterer partieller Mangel wurde durch Hinzufügung von 100 mg Methionin zu je 100 gr der 4H-Diät hergestellt. Das Futter enthielt somit 133 mg Gesamtmethionin, also 30% des Bedürfnisses.

3. *d)* Dritteldiät (1/3,0) ; 10% Leim, 5% Casein, 3% Hefemehl als Eiweissquellen. In 100 gr Futter 198 mg Methionin, 35% des Bedürfnisses.

3. *e)* Halbdiät ; 7,5% Leim, 7,5% Casein, 3% Hefemehl als Eiweissquellen, die übrigen Bestandteile wie in 4H. 100 gr Nahrung enthielt 281 mg Methionin, 51% des Bedürfnisses.

3. *f)* Zweidritteldiät (2/3,0) ; 5% Leim, 10% Casein, 3% Hefemehl als Eiweissquellen. 100 gr Futter enthielt 363 mg Methionin, 66% des Bedürfnisses.

3. *g)* Diät mit Cystinergänzung ; Zu der Mangeldiät 4H wurde 1% Cystin gemischt um bei dem bestehenden Methioninmangel ein Defizit von SH Radikal vollständig auszuschalten.

Die verschiedenen Gruppen der Versuchstiere wurden 60 Tage lang mit der entsprechenden Diät gefüttert und wir konnten sämtliche krankhafte Prozesse beobachten, die bereits in unseren früheren Arbeiten beschrieben wurden. (Zusammenfassende Mitteilung ; *Sós*, Pankreasveränderung (15, 16) ; *Véghelyi, Kemény, Pozsonyi, Sós*, (17) Veränderungen der Lungen ; *Kemény, Sós, Véghelyi*, (7)Eiweissstoffwechsel ; *Kemény, Véghelyi, Sós* (8)). Innerhalb dieser Zeit sind die Tiere, die an einer totalen Mangeldiät gehalten wurden, ohne Ausnahme, die mit partieller Mangeldiät gefütterten zum grössten Teil eingegangen und histologisch verarbeitet worden.

Ergebnisse

Bei den mangelhaft genährten Tieren liessen sich an den Hoden zweierlei Veränderungen beobachten. Bei einem Teil der Tiere entwickelte sich ein degenerativer Prozess, demzufolge die Spermiogenese aufhörte (1. Abb.). Diese Veränderung trat gewöhnlich schon 40 Tage nach Beginn der Diät in Erscheinung. Die andere Veränderung zeigte sich in einer auf die Follikel lokalisierten Nekrose



Abb. 1. Degeneration von Hoden mit Azoospermie, herbeigeführt an Ratten mittels Methionin-Mangeldiät

(2. Abb.) und war eher bei den stärkeren Graden der Mangeldiät zu beobachten, obwohl sie in sämtlichen Gruppen vorzufinden war.

Der Penis erschien sehr oft priapisch (Tab. I).

Das seltenere Auftreten des Priapismus bei totalem Methioninmangel, als bei partieller Diät erklären wir damit, dass es bei diesen Versuchstieren zu

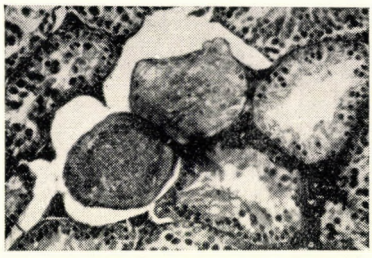


Abb. 2. Mikronekroses in Hoden von Ratten, als Folge von Methionin-Mangels

rasch zur Entwicklung der Dystrophie kam und sie in kurzer Zeit eingingen. Bei Anwendung der partiellen Diät blieben die Tiere länger am Leben, die Schädigung wurde verzögert mit eher chronischem Charakter. Bei der ersten Gruppe trat der Tod zu rasch ein um genügend Zeit zur Entwicklung der sexuellen Schädigung zu lassen, wogegen in den Gruppen 3. a.—3. g. die Zeit zum Auftreten des Priapismus ausreichte.

1. TABELLE

Diät-Gruppe	Zahl der Versuchstiere	Hievon waren priapisch
1. Methioninmangel	78	11
2. a. Normale Kontrolle	60	0
2. b. Komplettierte Kontrolle	10	0
Partieller Methioninmangel:		
3. a. Partieller komplettierte	7	7
3. b. » »	6	5
3. c. » »	4	4
3. d. -Dritteldiät »	13	13
3. e. Halbdiät »	10	5
3. f. Zweidritteldiät	10	2
3. g. Cystindiät	6	5
Bei partieller Mangeldiät insgesamt	56	41

Das Auftreten des Priapismus war im allgemeinen in dem letzten Drittel oder Viertel der Periode zwischen dem Beginn der Diät und dem Tode des Tieres zu beobachten und blieb bis zum Lebensende bestehen. Die zeitlichen Verhältnisse sind durch an 20 Ratten gewonnenen Angaben in der 3. Abbildung veran-

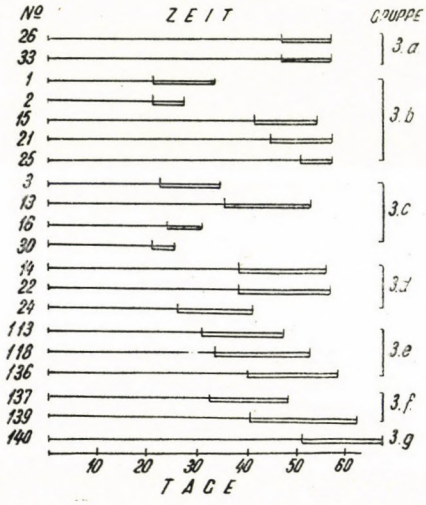


Abb. 3. Das zeitliche Verhältnis zwischen Mangeldiät und Priapismus. Einzelne Linie: Dauer der Diät vor dem Priapismus. Doppelte Linie: Dauer des Priapismus

schaulicht. Die durchschnittliche Lebensdauer dieser Tiere betrug 46 Tage und das Auftreten des Priapismus fiel durchschnittlich auf den 34. Tag. In den normalen Kontrollgruppen war eine ähnliche krankhafte Veränderung in keinem einzigen Falle zu beobachten.

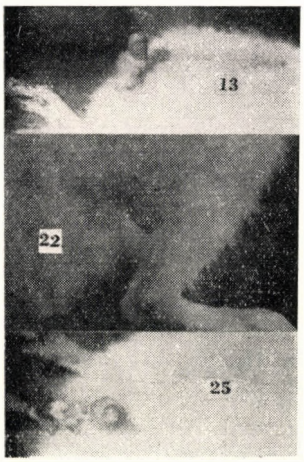


Abb. 4. Priapismus von Ratten infolge Mengeldiät

Diskussion

Es stellt sich naturgemäss die Frage, auf welcher Weise die beobachteten pathologischen Erscheinungen zustande kommen.

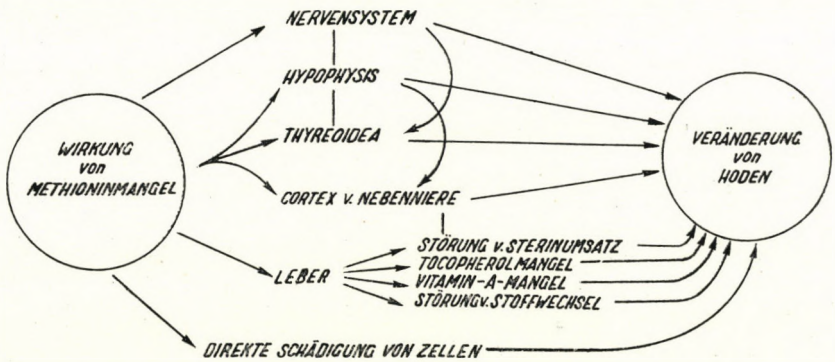


Abb. 5. Die Wege der Hodenveränderungen infolge von Methionin-mangel

Für die Entwicklung der Hodenschädigung gibt es zwei Erklärungen (s. Abb. 5.). Die Mangeldiät verursacht in dem ganzen Organismus eine Störung in dem Eiweissaufbau, demzufolge wird auch die Bildung der Nucleoproteide in Mitleidenschaft gezogen und somit findet eine direkte Schädigung der Zellen

statt. Eine solche Wirkung kommt ohne Zweifel auch an den Hoden zur Geltung. Dabei ist aber auch die Tätigkeit des neuroendokrinen Systems gestört. Die in dem zentralen Nervensystem durch Mangeldiät herbeigeführten Veränderungen wurden in unseren neuesten Beobachtungen geklärt. Die Wirkung des pathologisch veränderten zentralen Nervensystems auf die Hoden ist unleugbar, selbst wenn uns der Weg und der Mechanismus des Prozesses noch unbekannt sind. Die andere Möglichkeit wäre die humorale Entwicklung der Veränderung. Die gonadotrope Hormonwirkung der Epyphyse und der Hypophyse ist in dieser Hinsicht allgemein bekannt, so wie auch der Einfluss der Schilddrüse [*Sidki, Domm, Williams*(13,5,19)] und der Nebenniere. Auf Grund der bisherigen neuroendokrinologischen Angaben nehmen alle diese Faktoren an der Beeinflussung der Hodenfunktion teil.

Die angewandte Diät verursacht eine fettige Entartung der Leber, welche nun der Cirrhose zustrebt. Und wie die Tierexperimente [*Selye, Adams*,(12, 1) usw.] und an Menschen ausgeführten Beobachtungen [*Alvizouri, Martin, Bennett, Baggenstoss* (2, 10, 19)] zeigen, geht jener Vorgang auch mit einer Degeneration der Hoden einher. Teils die schädigende Wirkung des pathologisch veränderten Grundumsatzes, teils die induzierte A-Avitaminose und E-Avitaminose bilden je ein Glied in der Ursachenkette des Prozesses. Die E-Avitaminose nimmt an dem Prozess sowohl durch ihre Rückwirkung auf die Hypophyse [*Verzár* (18)], als auch durch ihre unmittelbar auf die Gonaden [*Sós* (15)] ausgeübte Wirkungteil. Dabei ist es auch zu berücksichtigen, dass die Erkrankung der Leber eine Störung in dem Sterinstoffwechsel herbeiführt. Dadurch entsteht auch in der Bildung der östrogenen und androgenen Stoffe eine Störung, die auf den Zustand der Hoden ebenfalls einen Einfluss ausübt. Bei den kranhaften Veränderungen des Hodens hat man also mit einer Verknüpfung von einer ganzen Reihe von Ursachen zu rechnen.

Hinsichtlich der Entwicklung des Priapismus sind in Zusammenhang mit unseren Versuchen die Anämie und die Stase von Geltung. *Getzoff, Diggs, Rosokoff, Levant* und *Stept* (6, 4, 11, 9) haben durch ihre Beobachtungen an Menschen nachgewiesen, dass gewisse Anämien neben Hodenveränderungen auch mit Priapismus einhergehen. *Getzoff* erklärt dies damit, dass die erkrankten Blutkörperchen in den kavernösen Körpern infolge der Abnahme der Oxygentension und der Verschiebung der H-Ionenkonzentration sich leichter zusammenballen und es somit rascher zu einer Stase kommt, als wenn die Blutkörperchen normal sind. In unseren Versuchen entstand eine schwere Anämie mit den Symptomen der Anisozytose, Poikilozytose, Heterochromasie und Hyperchromie. Diese Tatsache dürfte die Erklärung von *Getzoff* unterstützen. Es muss sich jedoch auch ein anderer Mechanismus geltend machen, da bei den völlig methioninfrei gefütterten Tieren ebenfalls eine schwere Anämie sich entwickelte und der Priapismus trotzdem seltener zu beobachten war, als bei partiellem Methioninmangel. Wahrscheinlich spielen in der Entwicklung des Priapismus ausser der physikalisch-chemischen

Wirkung der Anämie auch die neuroendokrinen Einflüsse eine entscheidende Rolle. Dass die Stase in Thrombose übergeht, ist bereits daraus ersichtlich, dass der experimentell hervorgerufene Priapismus sich nicht mehr löst, sondern bis zum Tode des in verfallenen Zustand geratenden Tieres bestehen bleibt.

Zusammenfassung

Die Entwicklung der Hodenveränderungen und des Priapismus wurde an 78 fast völlig methioninfrei gefütterten, an 56 an partiellem Methioninmangel leidenden und an 70 normalen männlichen Ratten untersucht. Die Hodenveränderungen traten bei sämtlichen Tieren auf, die Mangeldiät erhielten, und zwar in Form von Mikronekrosen und degenerativen Erscheinungen. Priapismus war hauptsächlich bei den an partiellem Methioninmangel leidenden Tieren zu beobachten.

In den einzelnen Abschnitten der Versuche waren *Dr. E. Kiss*, *Dr. R. Horváth* und *Dr. G. Dávid* behilflich, wofür wir ihnen auch an dieser Stelle bestens danken.

LITERATUR

1. *Adams, E. M., Spencer, H. C., Rowe, V. K.:* D. D. Irish Arch. Indust. Hyg. Occup. Med. **1**, 225, (1950).
2. *Alvizouri, M. Gomez, M. F.:* Revista Invest. Chim. (Mexico.) **2**, 41, (1950).
3. *Bennett, H. S., Baggenstoss, A. H., Butt, H. R.:* Amer. J. Clin. Path. **20**, 814, (1950)
4. *Diggs:* Zit. *Getzoff.*
5. *Domm, L. V., Blivaiso, B. B.:* Amer. J. Anat. **82**, 167, (1948).
6. *Getzoff, P.:* J. Urologie **48**, 407, (1942).
7. *Kemény, T., Sós, J., Véghelyi, P.:* Kísérletes Orvostud. **3**, 128, (1951).
8. *Kemény, T., Véghelyi. P., Sós, J.:* Kísérletes Orvostud. **1**, 137, (1949).
9. *Levant, B., Stept, R.:* J. Urologie **50**, 328, (1948).
10. *Martin, E., Morsier, G., Alphonse, P.:* Schweiz. Med. Wschr. **79**, 511, (1944).
11. *Rosokoff, J., Bredie, E. L.:* J. Urologie **56**, 544, (1947).
12. *Selye, H.:* Textbook of Endocrinology. Montreal, 914, (1948).
13. *Sidki, Y.:* J. Physiol. **75**, 30, (1932).
14. *Sós, J.:* Magy. Biol. Kut. Int. Munkái. **13**, 512, (1941).
15. *Sós, J.:* Kísérletes Orvostud. **3**, 67, (1951).
16. *Sós, J.:* Kísérletes Orvostud. **2**, 306, (1950).
17. *Véghelyi, P., Kemény, T., Pozsonyi, J., Sós, J.:* Acta Med. Hung. **2**, 155 (1950); Amer. J. Dis. Child. **73**, 658, (1950).
18. *Verzár, F.:* Pflügers Arch. 227, 499, (1931); Biochem. Z. 240, 19, (1931).
19. *Williams, R. H., Weinglass, A. R., Bissel, G. W., Peters, J. B.:* Endocrinology **34**, 317, (1944).

ИЗМЕНЕНИЯ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ КРЫС САМЦОВ ВСЛЕДСТВИЕ НЕДОСТАТКА МЕТИОНИНА

И. Шош, Т. Кемень и М. Шнелл

Патофизиологический институт медицинского университета, Будапешт

Р е з ю м е

Авторы исследовали частичные явления при описанной уже раньше экспериментальной алиментарной дистрофии в половых органах над 78 животными, выдержанными на корме, не содержащем почти совсем метионины, над 56 страдающими в частичном недостатке метионина и над 70 животными, служащими для контроля. Микронекрозы и дегенеративные изменения яичек проявлялись почти у всех животных, выдержанных на недостаточном режиме питания, равным образом у животных, кормленных на полном, как и на частичном недостатке метионина. Приапизм наблюдался, главным образом, у животных, получавших недостаточно метионина, а именно, из 56 крыс в 41 случаев. Приапизм проявлялся у этих животных в среднем на 34 день диэты. Из 78 крыс, выдержанных на корме с сильным недостатком метионина, авторы наблюдали приапизм лишь в 11 случаях. По всей вероятности, повреждения на половых органах не могли развиваться у этих животных, вследствие их слишком скорой гибели.

BUCHBESPRECHUNG

J. Szentágothai :

»DIE ROLLE DER EINZELNEN LABYRINTHRECEPTOREN BEI DER ORIENTATION VON AUGEN UND KOPF IM RAUME«

Verlag der Ungarischen Akademie der Wissenschaften,
Budapest, 1952. 129 S., 48 Abb., geb. 24.— Ft.

Die ausserordentlich wertvolle Monographie von *Szentágothai* und Mitarbeitern, welche auf selbständigen experimentellen Untersuchungen beruht, die ein wichtiges Problem der Neurologie, sowie der Physiologie der Sinnesorgane lösen, ist ein erfolgreiches Ergebnis der mit physiologischen Methoden arbeitenden und das Problem ins Feld der Physiologie stellenden anatomischen, bzw. neuro-anatomischen Forschung.

Die Augenbewegungen (sowie deren pathologische Manifestationen, insbesondere der Nystagmus) bilden einerseits das wichtigste Grundphänomen der Orientierung andererseits bedeuten sie bei den Säugetieren eine der wichtigsten Verbindungen zwischen der Funktion zweier Sinnesorgane. Die Tatsache einer Verbindung zwischen den Augenbewegungen, oder richtiger den Oculomotoriuskernen, und den Labyrinthreceptoren wurde bereits vor langer Zeit erkannt, jedoch stiess ihre genauere Analyse auf grosse Schwierigkeiten deshalb, weil das mit ihr im Zusammenhang stehende auffallendste Phänomen, der Nystagmus ausserordentlich komplex ist und diesen zahlreiche nervöse Faktoren beeinflussen, ferner, weil dieser nur besonders schwer in seine Teile zerlegt werden kann.

Der grosse ungarische Forscher *Endre Hőgyes* legte bereits vor siebzig Jahren — auf Grund zahlreicher wertvoller und grundlegender Experimente — seine Ansicht dar, dass jeder Bogengang mit den beiden, mit ihm in gleicher Ebene befindlichen Augenmuskeln in unmittelbarer Verbindung steht und die komplizierteren Augenbewegungen aus den Kombinationen dieses Grundmechanismus zusammengesetzt sind. Die auf die Haltungs- und Einstellungsreflexe bezüglichen Untersuchungen von *Magnus* und Mitarbeitern haben dieses Problem wiederum in den Vordergrund gerückt und an Hand der Untersuchung des Nystagmus wurde *Hőgyes's* Feststellung verworfen, bzw. geriet diese in Vergessenheit eben deshalb, weil der Kontraktionstonus der Augenmuskeln komplizierte, von der Intensität des Reizes abhängige Phänomene hervorruft und weil (wie dies *Lorente de Nó* bei seinen elektrophysiologischen Untersuchungen beobachtete) die Reizung gleichwelchen Labyrinthreceptors in jedem Augenmuskel eine, mit dem Nystagmus zusammenhängende Funktionsveränderung verursacht. Praktisch konnte beim Labyrinth von Säugetieren die separierte und einseitige Reizung der einzelnen Labyrintreceptoren auch gar nicht gelöst werden. Umgekehrt, können — wie auch *Loevenstein* im Laufe seiner an Wirbellosen durchgeführten Untersuchungen darauf hinwies — die bei Wirbellosen gewonnenen Erfahrungen nicht unmittelbar auf Lebewesen höherer Ordnung bezogen werden.

Obwohl anatomisch nachweisbar zwischen dem Deiterskern und der gesamten Strukturmuskulatur äusserst zahlreiche Verbindungen bestehen, welche sich auf die Augenmuskeln erstrecken und auch das Kleinhirn mit einbeziehen, kann es vom biologischen Gesichtspunkt aus nicht genügend erklärt werden, wie aus dieser strukturell ausserordentlich komplizierten und diffusen Integration die, unter normalen Umständen mit besonders kurzer Latenzzeit eintretende koordinierte Bewegung der Augenmuskeln zustandekommt, noch, was selbst beim Nystagmus das Einhalten der *Flourens'schen* Regel gewährleistet : dass nämlich die Augenbewegungen stets in der Ebene desjenigen Bogenganges geschehen, welcher annehmbarerweise unter Irritation steht.

Szentágothai löst, auf Grund anatomischer Angaben, welche mittels der Degenerationsmethode des Achsenfadens und der Synapsis ausgearbeitet wurden, die Reflexbeziehungen

zwischen Labirinth und Augenmuskel in elementare Reflexbogen von drei Neuronen und in Reflexbogen höherer Ordnung von mehr Neuronen auf, und ermöglicht durch entsprechenden operativen Eingriff ihre isolierte Untersuchung. Das Ziel seiner Experimente ist die Klärung der anatomisch fixierten Korrelationen der spezifisch dreineuronischen Verbindungen zwischen dem vestibulären System und den Augenmuskeln. In den einzelnen Bogengängen wurden durch eine mit Hilfe stereoskopischen Mikroskops eingeführte Mikrokanüle künstliche Endolymphströmungen hervorgerufen und die Bewegung der entsprechenden Augenmuskeln isotonisch, bzw. im Falle der quantitativen Berücksichtigung der chronologischen Verhältnisse isometrisch registriert. In Verbindung mit der Irritation wurden stets mit der Reizstärke proportionelle Kontraktionen — von kurzer Latenzzeit der in die Ebene der einzelnen Bogengänge fallenden Muskeln, sowie gleichzeitig an den Antagonisten eine verzögerte Hemmung beobachtet. Eine Endolymphströmung von entgegengesetzter Richtung verursachte in den entsprechenden Muskeln prompte Hemmung. Neben diesen typischen Grundreflexen, welche den Intersektionsexperimenten gemäss vom hinteren Teil des Tractus longitudinalis abhängen, sind auch zahlreiche atypische Reflexe zu beobachten, welche vom funktionellen Zustand der Gehirnstammszentren bestimmt werden. Die Bahn der typischen Reflexe ist auch bei anderen Tieren mit spezifisch normaler Augenlage (Katze, Hase) die gleiche. Diese spezielle und typische, in der Raumebene genauen Zusammenhang gebende Reflexverbindung kristallisierte sich phylogenetisch und ontogenetisch aus einem komplexen, die koordinierten Bewegungen auch auf niedrigerer Stufe gewährleistenden System erst später heraus. Auf Grund dieses ist es zu erklären, wie die in verschiedenen komplizierten Kombinationen vor sich gehende Funktion der Augenmuskeln zustandekommt, so wie auch, dass eine Endolymphströmung von entgegengesetzter Richtung entgegengesetzt gerichtete Reflexe hervorruft. Gegenüber der Kontraktion der Agonisten geschieht die Hemmung der Antagonisten durch die dazwischenliegenden Neurone mit grosser Latenzzeit und mittels subnormaler Zustände. Dies löst die auf die weiteren komplizierten Augenbewegungen bezüglichen Probleme, welche in dem Fall, wo Reizung und Hemmung von gleicher anatomischer Gebundenheit wären, den Anpassungseffekt des Reflexes unmöglich machen würden. Solche Effekte sind, nach *Gömöry's* Untersuchungen auch bezüglich der Hals- und Genickmuskeln nachzuweisen.

Es ist ein sehr wichtiges Ergebnis der mittels mikromanipulatorischer Reizung des häutigen Labyrinthes, der Macula und des Utriculus durchgeführten Experimente, dass auf Grund dieser der Verfasser, gegenüber der bisher akzeptierten *Magnus-de Kleyn'schen* Theorie, die Maculae als einen nicht einheitlichen Receptor betrachtet, an dessen einzelnen Teilen (an der Oberfläche der Macula utriculi) er in jeweils anderer Kopflage irritierte und mit bestimmten Augen- und Halsmuskeln verbundene Quadranten unterscheidet. Die Macula sacculi ist nach dem Verfasser kein Vibrations-, sondern ein akzessorischer statischer Receptor. Zur Interpretierung der zeitlichen Verschiebung zwischen den — sowohl die symmetrischen als auch die assymetrischen Reflexe hervorrufenden — makulären Reflexen und den Reflexen des Bogenganges nimmt *Szentágothai* an, und beweist dies auch z. T. mit Experimenten, dass die Verrückung der häutigen Bogengänge spezielle Reflexe auslöst, mit deren Voraussetzung die vom Labyrinth herrührenden linearen Beschleunigung- und Zentrifugalreflexe erklärt werden können. Dieser Reflex würde die bei schneller Bewegung eintretenden Bogengangsreflexe solange unterstützen, bis der sich langsam entwickelnde und die Lage der Augenmuskeln aufrechterhaltende makuläre Reflex seine volle Intensität erreicht.

Es ist interessant, dass die von den originalen Ansichten *Hőgyes's* ausgehenden und vom theoretischen und praktischen Standpunkt aus wichtigen neuen Schlussfolgerungen des Verfassers auch durch die, in neuester Zeit völlig unabhängig von ihm an Wirbellosen durchgeführten Untersuchungen *Loevenstein's* in ihren Hauptlinien bestätigt werden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die mit der Funktion der Maculae zusammenhängenden Probleme auch heute noch Gegenstand einer ausgedehnten literarischen Diskussion bilden. Auf jeden Fall legte der Verfasser, als Morphologe, von seiner äusserst grossen experimentellen Gewandtheit und seiner produktiven schöpferischen Phantasie in dieser komplizierten Frage ein hervorragendes Zeugnis ab und erreichte — über die Bestätigung der Morphologie hinaus — grundlegend wesentliche und experimentell bewiesene physiologische Resultate. Und durch die Wiederbelebung von *Hőgyes's* Untersuchungen und ihrer Bestätigung mittels neuer Methoden gab er ein Beispiel für den Kampf gegen den Kosmopolitismus und für die Weiterentwicklung der ungarischen wissenschaftlichen Traditionen.

Prof. *Kálmán Lissák*

Anton Babics und *Franz Rényi-Vámos*

THEORIE UND KLINIK DER ZERSTÖRUNG DER NIERE

Verlag der Ungarischen Akademie der Wissenschaften
Budapest. 1952. 209 S., geb. 40.— Ft

In diesem reichlich illustrierten (150 Originalabbildungen), mit einem Dokumentenschatz von zahlreichen experimentellen Angaben und klinischen Beobachtungen versehenen Werke heben die Verfasser einen neuen pathogenetischen Gesichtspunkt hervor, welcher in der Krankheitsentwicklung einiger mit Destruktion der Nierenparenchyms einhergehender Erkrankungen eine Rolle spielt. Im Zentrum der erweiterten pathogenetischen Konzeption der Autoren steht die Erkenntnis der pathogenetischen Rolle des bisher gänzlich unbeachteten, bzw. in manchen Beziehungen noch unbekannten Lymphkreislaufes der Niere. Zweifellos stichhältig ist die folgende Feststellung der Autoren in der Einleitung ihres Werkes : »Nebst dem Blutkreislaufe haben wir die Lymphströmung nicht in Betracht gezogen und es wurde eine Theorie der Nierenfunktion aufgebaut, in welcher die Lymphe und die Lymphströmung ausser Acht geblieben sind.« Dies gilt natürlich nicht nur für die Physiologie der Niere, sondern in noch höherem Masse für das Problem der Pathogenese der einzelnen Nierenerkrankungen. Der Lymphkreislauf der Organe bildet wahrscheinlich einen ansehnlichen Teil ihres Saftstromes und kann eine bedeutende Rolle in ihren physiologischen Vorgängen und pathologischen Zuständen spielen. Dessenungeachtet wurde der Bedeutung der Störungen des Lymphkreislaufes bei Erkrankungen von einzelnen Organen im allgemeinen eine recht geringe Aufmerksamkeit in der Pathologie geschenkt ; diese Tatsache lässt sich teilweise vielleicht auf die Spärlichkeit unserer anatomisch-physiologischen Kenntnisse des Lymphkreislaufes zurückführen.

Auf Grund ihrer experimentellen und klinischen Beobachtungen weisen die Verfasser darauf hin, dass der Zustand des Lymphkreislaufes eine entscheidende Rolle in der Pathogenese einiger mit bedeutender Parenchymzerstörung einhergehender Nierenaffektionen spielen kann. Ohne auf die Einzelheiten der reichlichen und vielseitigen, sowohl vom theoretischen, als auch vom praktisch-klinischen Standpunkt wertvollen Angaben einzugehen, ist als wesentlich hervorzuheben, dass bei zahlreichen Nierenerkrankungen das Mass der Nierenparanchymdestruktion, somit eigentlich das Schicksal der kranken Niere — nebst anderen Faktoren — durch die mechanische oder dynamische Insuffizienz des Lymphkreislaufes der Niere bestimmt wird. Diese Erkenntnis kommt selbstredend als ein wichtiges richtunggebendes Grundprinzip auch für die Praxis bei der Behandlung der in Frage kommenden Nierenaffektionen zur Geltung.

Indem die Verfasser die Pathogenese der einzelnen Nierenerkrankungen durch den Lichtstrahl einer neuen pathologischen Anschauung beleuchten, wobei sie auf die durchgreifende Bedeutung des Lymphkreislaufes in den Zerstörungsprozessen der Niere hinweisen, eröffnen sie hierdurch nicht nur einen neuen Pfad für die Pathologie der Niere : ihr Werk ist auch geeignet, den erwähnten Gesichtspunkten auch auf anderen Gebieten der Medizin Geltung zu verschaffen. Nachdem das Buch zahlreichen der Lösung harrenden Problemen mittelbar neue Wege weist, ist es nicht nur für jene wertvoll, die sich für die Fragen der Nierenpathologie des näheren interessieren, sondern es kann auch auf das Interesse breiterer Kreisen von Physiologen, Pathologen und Kliniker Anspruch erheben.

Prof. *György Romhányi*

A STATEMENT BY THE EDITORS CONCERNING CERTAIN ARTICLES WRITTEN BY PROF. B. ISSEKUTZ, JR. AND HIS CO-WORKERS

In No. s 3—4, Vol. II., 1951 of this periodical the following papers written by prof. B. Issekutz, Jr. and his co-workers have been published :

B. Issekutz, Jr., I. Lichtneckert, Zs. Gáspár—Németh, G. Hetényi, Jr. and J. Szilárd : Tissue metabolism and peripheral circulation I. Effect of iodoacetic acid on the metabolism of muscles in vivo. (Page 369).

B. Issekutz, Jr., I. Lichtneckert, Zs. Gáspár—Németh and G. Hetényi, Jr. : Tissue metabolism and peripheral circulation II. Effect of iodoacetic acid on peripheral circulation (Page 381).

B. Issekutz, Jr., I. Lichtneckert, G. Hetényi, Jr., Zs. Gáspár—Németh and A. Diósy : Tissue metabolism and peripheral circulation III. Effect of fluoracetic acid on the metabolism and circulation of muscles in vivo (Page 391).

B. Issekutz, Jr., I. Lichtneckert, Zs. Gáspár—Németh, G. Hetényi, Jr., A. Diósy and G. Pálkó : Tissue metabolism and peripheral circulation. IV. Factors affecting local vascular responses (Page 403).

It has recently come to the knowledge of the Editors that these discussions had also been published in the scientific journal »Archives intern. de Physiologie«, virtually unaltered and at about the same date.

To offer the same original articles for publication to two journals at the same time is a procedure inconsistent with the ethics of scientific publishing and as such it is condemned by the Editors, who, while expressing their regret for the double publication, cannot absolve the authors from responsibility, since they saw fit to conceal from them the fact that the articles had been sent to an other journal as well.

INDEX

G. Dénes und *Zs. Gazda :* Untersuchungen über die enzymatische Synthese der Säureamid- und Peptidbindung. I. Die enzymatische Synthese von Glutamin in Lupinus Albus — Г. Денеш и Ж. Газда: Об энзиматическом синтезе амида кислоты и пептидной связи. I. Энзиматический синтез глютамина в Lupinus Albus ... 1

I. Banga and *D. Schuler :* Contributions to the structure of elastin with special reference to the action of elastase. — И. Банга и Д. Шулер: Данные к структуре эластина на основе механизма действия эластазы 13

J. Domonkos and *I. Huszák :* Effect of antihistamine substances on brain respiration. — И. Домонкош и И. Хусак: Действие антигистаминов на мозговое дыхание 25

M. Székely, S. Mányai und *F. B. Straub :* Die Wirkung der Hämolyse auf den Stoffwechsel der roten Blutkörperchen beim Menschen. — М. Секей, С. Маньаи и Б. Штрауб: Влияние гемолиза на обмен веществ красных кровяных шариков у человека 31

A. J. Ángyán and *Z. P. Soós :* Neurohumoral mechanism of the sexual function of male frogs. — А. Я. Андьян и З. П. Шош: Нейрогуморальный механизм половых функций лягушек самцов 45

A. J. Ángyán, L. Menyhárt and *J. Szabó :* Electrophysiological analysis of the natural clasping activity of frogs. — А. Я. Андьян, Л. Меньхарт и Я. Сабо: Электрофизиологический анализ естественной обнимающей активности лягушек 55

Sz. Donhoffer, Gy. Mestyán, E. Obrincsák—Pap, T. Pap and *I. Tóth :* The mechanism of the rise in 0_2-consumption in hyperthermia. — С. Донгоффер, Д. Мештьян, Е. Обринчак-Пап, Т. Папи И. Тот: Механизм повышения энергетического обмена, связанного с гипертермией 63

A. K. Pfeifer, I. Pataky and *M. Forbáth :* Central regulation of the adrenaline-induced increase in metabolic rate. — А. К. Пфейфер, И. Патаки и М. Форбат: Центральная регуляция повышения обмена веществ, вызванного адреналином 71

G. Hetényi, jr., I. Lichteneckert, M. Bedő and *G. Palkó :* Contributions to the physiological action of adrenaline. — Г. Хетеньи мл., И. Лихтенекерт, М. Бедэ и Г. Палко: О физиологическом действии адреналина 83

M. Winter : Effect of monofluoroacetic acid on the intestinal absorption of glucose and glycine. — М. Винтер: Влияние монофторуксусной кислоты на кишечную абсорбцию глюкозы и глицина 91

I. Fényes und *A. Hedri :* Zur Frage der Osmoregulation des Liquordruckes. — И. Феньеш и А. Хедри: К вопросу осмотической регуляции давления ликвора 97

J. Pórszász, L. Tardos, F. Herr, M. Nyiri : Prüfung der analgetischen Wirkung und der gekreuzten Gewöhnung an die Analgetika bei Ratten. — И. Порсас, Л. Тардош, Ф. Херр и М. Нири: Исследование аналгетического действия и скрещенной привычки по отношению к болеутоляющим средствам у крыс 107

F. Herr, L. Tardos und *J. Pórszász :* Messung der analgetischen Wirkung — II. Spezifizität der Methode ; Lokalisation der Schmerzreaktion bedeutenden Bewegung im Zentralnervensystem. — Ф. Херр, Л. Тардош и И. Порсас: Измерение болеутоляющего действия. II: Специфичность метода ; локализация движения реакции боли центральной нервной системы 123

J. Knoll, E. Komlós und *L. Tardos :* Über die Rolle der Eiweissbindung im Synergismus der Analgetika und Parasympathomimetika. — И. Кнолл, Е. Комлош и Л. Тардош: О роли белковых соединений в синергизме болеутоляющих средств и парасимпатомиметиков 131

J. Pórszász und *L. György :* Untersuchungen über die pharmakologische Wirkung der Quaternärtropeine und der TEA-artigen ganglion-blockierenden Substanzen. — И. Порсас и Л. Дьердь: О фармакологическом действии четвертичных тропеиновых веществ и ТЕА подобных средств, парализирующих ганглий..... 141

L. Gyermek and *K. Nádor :* Studies on cholinergic blocking substances. III. Neuromuscular blocking tropeines. — Л. Дьермек и К. Надор: Исследования веществ, парализирующих холинерг. III. Невромускулярные парализирующие тропеины..... 159

G. Ivánovics and *S. Horváth :* The structure of the capsule of b. Megatherium. — Д. Иванович и Ш. Хорват: О структуре капсулы Bacillus Megatherium 175

J. Baló and *I. Banga :* Change in the elastase content of the human pancreas in relation to arteriosclerosis. — И. Бало и И. Банга: Изменение содержания эластаза в поджелудочной железе человека вследствие артериосклероза..... 187

P. Adler, T. Bányász, T. Jávor, L. Kesztyűs, M. Simon, T. Szilágyi, E. Varga und *St. Went :* Novocainazoprotein und Novocainallergie. — П. Адлер, Т. Баньяс, Т. Явор, Л. Кестьюш, М. Шимон, Т. Силадьи, Е. Варга и С. Веит: Новокаиназопротеин и аллергия новокаина 195

J. Soós, T. Kemény und *M. Schnell :* Genitale Veränderungen an männlichen Ratten verursacht durch partiellen Methioninmangel. — И. Шош, Т. Кемень и М. Шнелл: Изменения половых органов крыс самцов вследствие недостатка метионина 211

Обзор книг — Buchbesprechung — Compte-rendu de livres — Book Review

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

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

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

Acta Physiologica, Eudapest 62, Postafiók 440.

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110·— forint ($ 6·50) par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise du Commerce Extérieur des Livres et Journaux »Kultúra« (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Compte-courant No. 45-790-057-50-032) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

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

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

Manuscripts should be typed and 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·— forint ($ 6·50) a volume. Orders may be placed with »Kultúra« Foreign Trade Company for Books and Newspapers Budapest, VI., Sztálin-út 21. Account No. 45-790-057-50-032) or with representatives abroad.

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

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

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind, mit Maschine geschrieben, 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 ($ 6·50). Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Aussenhandels-Unternehmen »Kultúra« (Budapest, VI., Sztálin-út 21. Bankkonto Nr. 45-790-057-50-032) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

56.— Ft

Akadémiai Kiadó, Budapest V., Alkotmány-utca 21. — Felelős: Mestyán János

Akadémiai nyomda, Budapest, V., Gerlóczy-utca 2. — 21172/52 — Felelős vezető: ifj. Puskás Ferenc

ACTA PHYSIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

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

REDIGIT

F. B. STRAUB

TOMUS IV FASCICULI 3—4

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BUDAPEST, 1953

ACTA PHYSIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA KÍSÉRLETES ORVOSTUDOMÁNYI KÖZLEMÉNYEI

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

Az *Acta Physiologica* orosz, francia, angol és német 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 04-878-111-48), külföld számára pedig

a »Kultúra« Könyv- és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál

Budapest VI., Sztálin-út 21. Bankszámla 45-790-057-50-032 sz.), vagy külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

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

«*Acta Physiologica*» выходит 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 Physiológica*» — 110 форинтов за том. Заказы в стране принимает Akadémiai Kiadó, (Budapest V., Alkotmány-utca 21. Текущий счет № 04-878-111-48), а для заграницы, предприятие по внешней торговле книг и газет «*Kultúra*» (Budapest VI., Sztálin út. 21. Текущий счет №: 45-790-057-50-032) или его заграничные представительства и уполномоченные.

ACTA PHYSIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS
E. ERNST, B. ISSEKUTZ SEN., G. IVÁNOVICS, N. JANCSÓ,
K. LISSÁK, E. T. SZÖRÉNYI

REDIGIT
F. B. STRAUB

TOMUS IV.

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
BUDAPEST, 1953

INDEX AUTORUM

A

Ádler, P., Bányász, T., Jávor, T., Kesztyűs, L., Simon, M., Szilágyi, T., Varga, E., Went, St. 195
Ángyán, A. J., Menyhárt, L., Szabó, J. ... 55
—, Soós, Z. P. 45

B

Bagdy, D. vide Szára, St. 229
Balkányi, I. vide Händel, M. 315
Baló, L., Banga, I. 187
Banga, I., Schuler, D. 13
— vide Baló, J. 187
Bányász, T. vide Ádler, P. 195
Bedő, M. vide Hetényi, G. jr. 83
Bonta, J. vide Herr, F. 355
Borsi, J. vide Herr, F. 363
Bustya, I. vide Putnoky Gy. 409

C

Cserey—Pechány, É. vide Ivánovics, G. 383

D

Dénes, G., Gazda, Zs. 1
Domonkos, J., Huszák, I. 25, 225
Donhoffer, Sz., Mestyán, Gy., Obrincsák—Pap, E., Pap, T., Tóth, I. 63, 291

E

Endrőczi, E., Lissák, K. 271
—, Tigyi, A. 287

F

Fényes, I., Hedri, A. 97
Forbáth, M. vide Pfeifer, A. K. 71

G

Gazda, Zs. vide Dénes, G. 1
Gláz, E. vide Weisz, P. 307
Gáspár—Németh, Zs., Issekutz, B. jun. ... 301
Gáti, T. vide Weisz, P. 307
Grastyán, E., Lissák, K., Hasznos, T. 253
—, —, —, Molnár, L. 241
—, —, Molnár, L. 261
Gyergyay, F. vide Putnoky, Gy. 409
Gyermek, L. 323, 333
—, Nádor, K. 159, 341
György, L. vide Herr, F. 355
— vide Pórszász, J. 141

H

Händel, M., Kertai, P., Sós, J., Weisz, K., Balkányi, I. 315
Hasznos, T. vide Grastyán, E. 241, 253
Hedri, A. vide Fényes, I. 97
Herr, F., Borsi, J., Pataky, Gy. 363
—, György, L., Porszász, J., Bonta, J. .. 355
— vide Pórszász, J. 107
—, Tardos, L., Pórszász, J. 123
Hetényi, G. jr., Lichtneckert, I., Bedő, M., Palkó, G. 83
Hoffman, E. vide Putnoky, Gy. 425
Horváth, I., Wix, G. 435
Horváth, St. vide Ivánovics G. 175, 401
Huszák, I. vide Domonkos, J. 25, 225

I

Issekutz, B. jun. vide Gáspár—Németh, Zs. 301
Ivánovics, G., Horváth, St. 175, 401
—, Koch, S., Cserey—Pechány, É. 383

J

Jávor, T. vide Ádler, P. 195

K

Kemény, T. vide Sós, J. 211
Kerestély, J. vide Putnoky, Gy. ... 409, 425
Kertai, P. vide Weisz, P. 307
— vide Händel, M. 315

Kesztyűs, L. vide Ádler, P. 195
Knoll, J., Komlós, E., Tardos, L. 131
— vide Komlós, E. 373
Koch, S. vide Ivánovics, G. 383
Komlós, E., Knoll, J., Tardos, L., Szász, V. 373
— vide Knoll, J. 131

L

Lichtneckert, I. vide Heténvi, G. jr. ... 83
Lissák, K. vide Endrőczi, E. 271
— vide Grastyán, E. 241, 253, 261

M

Mányai, S. vide Székely, M. 31
Menyhárt, L. vide Ángyán, A. J. 55
Mestyán, Gy. vide Donhoffer, Sz. .. 63, 291
Molnár, L. vide Grastyán, E. 241, 261

N

Nádor, K. vide Gyermek, L. 159, 341
Nyiri, M. vide Pórszász, J. 107

O

Obrincsák-Pap, E. vide Donhoffer, Sz. 63, 291

P

Palkó, G. vide Heténvi, G. jr. 83
Pap, T. vide Donhoffer, Sz. 63, 291
Pataky, Gy. vide Herr, F. 363
Pataky, I. vide Pfeifer, A. K. 71
Pfeifer, A. K., Pataky, I., Forbáth, M. .. 71
Pórszász, J., Tardos, L. Herr, F., Nyiri, M. 107
—, György, L. 141
— vide Herr, F. 123, 355
Putnoky, Gy., Kerestély, J., Gyergyay, F., Bustya, I. 409
—, —, Hoffmann, E., Bustya, I. 425

S

Simon, M. vide Ádler, P. 195
Sós, J., Kemény, T., Schnell, M. 211
— vide Händel, M. 315
Soós, Z. P. vide Ángyán, A. J. 45
Schnell, M. vide Sós, J. 211
Schuler, D. vide Banga, I. 13
Straub, F. B. 235
— vide Székely, M. 31

Sz

Szabó, J. vide Ángyán, A. J. 55
Szára, St., Bagdy, D. 229
Szász, V. vide Komlós, E. 373
Székely, M., Mányai, S., Straub, F. B. . 31
Szilágyi, T. vide Ádler, P. 195

T

Tardos, L. vide Herr, F. 123
— vide Knoll, J. 131
— vide Komlós, E. 373
— vide Pórszász, J. 107
Tigyi A. vide Endrőczi, E. 287
Tóth, I. vide Donhoffer, Sz. 63 291

V

Varga, E. vide Ádler, P. 195
Vasenszky, Sz. vide Weisz, P. 307

W

Weisz, P., Gláz, E., Kertai, P., Weisz, K., Vasenszky, Sz., Gáti, T. 307
Weisz, K. vide Händel, M. 315
— vide Weisz, P. 307
Went, St. vide Ádler, P. 195
Winter, M. 91
Wix, G. vide Horváth, I. 435

INDEX

BIOCHEMIA

Banga, I. and *Schuler, D.:* Contributions to the structure of elastin with special reference to the action of elastase. — И. Банга и Д. Шулер: Данные к структуре эластина на основе механизма действия эластазы 13

Dénes, G. und *Gazda, Zs.:* Untersuchungen über die enzymatische Synthese der Säureamid- und Peptidbindung. I. Die enzymatische Synthese von Glutamin in Lupinus Albus. — Г. Денеш и Ж. Газда: Об энзиматическом синтезе амида кислоты и пептидой связи. I. Энзиматический синтез глютамина в Lupinus Albus 1

Domonkos, J. and *Huszák, I.:* Effect of antihistamine substances on brain respiration. — И. Домонкош и И. Хусак: Действие антигистаминов на мозговое дыхание 25

Domonkos, J. und *Huszák, I.:* Über die Katalaseaktivität von Histamin- und Antihistamin-Häminkomplexen. — Я. Домонкош и И. Хусак: О каталазном действии комплексов гистамина и антигистамина-гемина 225

Straub, F. B.: Über die Akkumulation der Kaliumionen durch menschliche Blutkörperchen — Ф. Б. Штрауб: Накопление K в человеческих эритроцитах 235

Szára, St. und *Bagdy, D.:* Über die Polysaccharide des Fibrinogens und Fibrins — И. Сара и Д. Багди: О полисахариде фибриногена и фибрина 229

Székely, M., Mányai, S. und *Straub, F. B.:* Die Wirkung der Hämolyse auf den Stoffwechsel der roten Blutkörperchen beim Menschen. — М. Секей, С. Маньаи и Б. Штрауб: Влияние гемолиза на обмен веществ красных кровяных шариков у человека 31

MICROBIOLOGIA

Adler, P., Bányász, I., Jávor, T., Kesztyűs L., Simon, M., Szilágyi, T., Varga, E. und *Went, St.* Novocainazoprotein und Novocainallergie. — П. Адлер, Т. Баньяс, Т. Явор, Л. Кестьюш, М. Шимон, Т. Силадьи, Е. Варга и С. Вент: Новокаиназопротеин и аллергия новокаина 195

Baló, J. and *Banga, I.:* Change in the elastase content of the human pancreas in relation to arteriosclerosis. — И. Бало и И. Банга: Изменение содержания эластаза в поджелудочной железе человека вследствие артериосклероза 187

Horváth, I. und *Wix, G.:* Wertbestimmung des Aureomycins mit der Agardiffusionsmethode. — И. Хорват и Д. Викс: Определение ауреомицина агар-диффузионным способом 435

Ivánovics, G. and *Horváth, S.:* The structure of the capsule of b. Megatherium. — Д. Иванович и Ш. Хорват: О структуре капсулы Bacillus Megatherium 175

Ivánovics, G., Koch, A. und *Cserey-Pechány, E.:* Untersuchung mit dem Virus der Aujeszkyschen Krankheit. — Д. Иванович, Ш. Кох и Е. Череи-Пехань: Исследования по вирусу Ауески 383

Ivánovics, G. and *Horváth, St.:* On the chemical structure of the capsule of B. anthracis and B. megatherium. — Д. Иванович и И. Хорват: Химическая структура капсулы B. antracis и B. megatherium 401

Putnoky, Gy., Kerestély, J., Gyergyay, F. and *Bustya, I.* : Immunological conditions of our transplantable mouse carcinoma strain. — Д. Путноки, Я. Керештель, Ф. Дьердяи, И. Буштя : Иммунитет по отношению к пересаживаемому штамму рака мышей 409

Putnoky, Gy., Kerestély, J., Hoffmann E. und *Bustya, I.* : Aetiology of our transplantable mouse tumours. — Д. Путноки, Я. Керештель, Е. Гоффманн и И. Буштя : Патогенез пересаживаемых опухолей мышей 425

Sós, J., Kemény, T. und *Schnell, M.* : Genitale Veränderungen an männlichen Ratten verursacht durch partiellen Methioninmangel. — И. Шош, Т. Кемень и М. Шнелл : Изменения половых органов крыс самцов вследствие недостатка метионина 211

PHARMACOLOGIA

Gyermek, L. and *Nádor, K.* : Studies on cholinergic blocking substances. III. Neuromuscular blocking tropeines. — Л. Дьермек и К. Надор : Исследования веществ, парализирующих холинергическую систему. III. Невромускулярные парализирующие тропеины 159

Gyermek, L. : Beiträge zur Pharmakologie vom Tryptamin, Tyramin und Phenylaethylamin — Л. Дьермек : Данные к фармакологии триптамина, тирамина и фенилэтимина 323

Gyermek, L. : Studies on cholinergic blocking substances IV. Correlation between structure and effect of quaternary derivatives of benzoyltropine and benzoyl ψ tropine compounds. — Л. Дьермек : Исследование веществ, парализирующих холинергическую систему, IV. Связь между химическим строением и действием у четвертичных производных соединений бензол-тропин и бензоил ψ тропин 333

Gyermek, L. and *Nádor, K.* : Studies on cholinergic blocking substances V. The pharmacology of monoquaternary tropeines acting on vegetative ganglia. — Л Дьермек и К. Надор : Исследование веществ парализирующих холинергическую систему : V. Фармакология моночетвертичных тропеинов действующих на вегетативные ганглии 341

Herr, F., Tardos, L. und *Pórszász, J.* : Messung der analgetischen Wirkung — II. Spezifizität der Methode ; Lokalisation der Schmerzreaktion bedeutenden Bewegung im Zentralnervensystem. — Ф. Херр, Л. Тардош и И. Порсас : Измерение болеутоляющего действия. II : Специфичность метода ; локализация движения реакции боли центральной нервной системы 123

Herr, F., György, L., Pórszász, J. und *Bonta, J.* : Untersuchungen über die Wirkung gefässerweiternder Mittel bei experimenteller renaler Hypertonie von Ratten. — Ф. Херр, Л. Дьердь, Я. Порсас и И.. Бонта : Исследование сосудорасширяюших веществу крыс при экспериментальной ренальной гипертонии 355

Herr, F., Borsi, J., Pataky, Gy.: Wirkung der Umwelttemperatur auf die Toxizität der Analgetika. — Ф. Херр, Я. Борши, Д. Патаки : Влияние окружающей температуры на токсичность болеутоляющих средств 363

Knoll, J., Komlós, E. und *Tardos, L.* : Über die Rolle der Eiweissbindung im Synergismus der Analgetika und Parasympathomimetika. — И. Кнолл, Е. Комлош и Л. Тардош : О роли белковых соединений в синергизме болеутоляющих средств и парасимпатомиметиков 131

Komlós, E., Knoll, I., Tardos, L., Szász, V. : Neue Methode zur Messung der lokomotorischen Reaktion von Versuchstieren (Untersuchungen mit Aktedron). — Э. Комлош, Я. Кнолл, Л. Тардош и В. Сас : Новый способ измерения локоморной реакции подопытных животных (исследования актедроном) 373

Pórszász, J., Tardos, L., Herr, M., Nyiri, M. : Prüfung der analgetischen Wirkung der gekreuzten Gewöhnung an die Analgetika bei Ratten. — И. Порсас, Л. Тардош, Ф. Херр и М. Нири : Исследование аналгетического действия и скрещенной привычки по отношению к болеутоляющим средствам у крыс 107

Pórszász, J. und *György, L.* : Untersuchungen über die pharmakologische Wirkung der Quaternärtropeine und der TEA-artigen ganglion-blockierenden Substanzen. — И. Порсас и Л. Дьердь : О фармакологическом действии четвертичных тропеиновых веществ и TEA подобных средств, парализирующих ганглий 141

PHYSIOLOGIA

Ángyán, A. J. and *Soós, Z. P.:* Neurohumoral mechanism of the sexual function of male frogs. — А. Я. Андьян и З. П. Шош: Нейрогуморальный механизм половых функций лягушек самцов 45

Ángyán, A. J., Menyhárt, L. and *Szabó, J.:* Electrophysiological analysis of the natural clasping activity of frogs. — А. Я. Андьян, Л.Меньхарт и Я. Сабо: Электрофизиологический анализ естественной обнимающей активности лягушек 55

Donhoffer, Sz., Mestyán, Gy., Obrincsák, E., Pap, T. and *Tóth, I.:* The mechanism of the rise in O_2-consumption in hyperthermia. — С. Донгоффер, Д. Мештян, Е. Обринчак-Пап, Т. Пап и И. Тот: Механизм повышения энергетического обмена связанного с гипертермией 63

Donhoffer, Sz., Mestyán, Gy., Obrincsák, E., Pap, T. and *Tóth, I.:* The thermoregulatory significance of the increase in O_2-consumption elicited by high environmental temperature. — С. Донгоффер, Д. Мештян, Е. Обринчак, Т. Пап и И. Тот: Роль повышения потребления O_2, возникающего при высокой внешней температуре, на теплорегуляцию 291

Endrőczi, E. and *Lissák, K.:* Role of the central nervous system in the regulation of the pituitary-adrenocortical system. — Е. Эндрэци и К. Лишшак: Исследования нервно-эндокринных корреляций роль центральной нервной системы в регуляции деятельности системы гипофиз — кора надпочечника 271

Endrőczi, E. and *Tigyi, A.:* The effect on steroid-compounds on the neuromuscular system.— I. Effects in vitro on the striated muscle of the frog. — Е. Эндрэци и А Тидь: Влияние соединений со стерановой структурой на нервную и мышечную деятельность. I. Действие in vitro на поперечнополосатую мускулатуру лягушек 287

Fényes, I. und *Hedri, A.:* Zur Frage der Osmoregulation des Liquordruckes. — И. Феньеш и А. Хедри: К вопросу осмотической регуляции давления ликвора 97

Gáspár—Németh, Zs. und *Issekutz, B. jun.:* Beiträge zum Wirkungsmechanismus des Azulenols. — Ж. Гашпар—Немет и Б. Ишшекуц: О механизме действия азуленола 301

Grastyán, E., Lissák, K., Hasznos, T. and *Molnár, L.:* Some functional properties of hypothalamic inhibition. — Е. Граштян, К. Лишшак, Т. Хаснош, Л. Мольнар: Особенности гипоталамического торможения 241

Grastyán, E., Lissák, K., Hasznos, T.: Analysis of hypothalamic reaction reversal. — Е. Граштян, К. Лишшак, Т. Хаснош: Условия обратимости реакции гипоталамуса 253

Grastyán, E., Lissák, K. and *Molnár, L.:* The functional relation between gyrus cinguli and caudate nucleus in the cat. — Е. Граштян, К. Лишшак, Л. Мольнар: Функциональная связь между поясной извилиной и хвостатым ядром у кошек 261

Händel, M., Kertai, P., Sós, J., Weisz, K. und *Balkányi, I.:* Beeinflussung der Experimentellen neurogenen Hypertonie durch Medikation und Diä bei Ratten. — М. Гендель П. Кертаи, И. Шош, К. Вейс и И. Балкани: Влияние лекарств и режима питания на экспериментальную нервогенную гипертонию у крыс 315

Hetényi, G. jr., Lichteneckert, I., Bedő, M. and *Palkó, G.:* Contributions to the physiological action of adrenaline. — Г. Хетеньи мл., И. Лихтенекерт, М. Бэдэ и Г. Палко: О физиологическом действии адреналина 83

Pfeifer, A. K., Pataky, I. and *Forbáth, M.:* Central regulation of the adrenaline-induced increase in metabolic rate. — А. К. Пфейфер, И. Патаки и М. Форбат: Центральная регуляция повышения обмена веществ, вызванного адреналином ... 71

Weisz, P., Gláz, E., Kertai, P., Weisz, K., Vasenszky, Sz. und *Gáti, T.:* Ausbildung des bedingten Reflexes in Verbindung mit der Funktion der Nebennierenrinde. — П. Вейс, Э. Глаз, П. Кертаи, К. Вейс, С. Вашенский и Т. Гати: Выработка условных рефлексов на функцию коры надпочечника 307

Winter, M.: Effect of monofluoroacetic acid on the intestinal absorption of glucose and glyine. — М. Винтер: Влияние монофторуксусной кислоты на кишечную абсорбцию глюкозы и глицина 91

Обзор книг — Buchbesprechung — Compte-rendu de livres — Book Review .....

Biochemia

ÜBER DIE KATALASEAKTIVITÄT VON HISTAMIN- UND ANTIHISTAMIN-HÄMINKOMPLEXEN

Von

J. DOMONKOS und I. HUSZÁK

HIRNFORSCHUNGSINSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, SZEGED

(Eingegangen: am 12. November 1952)

Um die Pathochemie neuroallergischer Reaktionsmechanismen unserem Verständnis näherbringen zu können, haben wir uns mit der Rolle der in diesem Reaktionsmechanismus zentral beteiligten biogenen Amine, in erster Linie mit dem Histamin, beschäftigen müssen. Es musste festgestellt werden, auf welche Weise das Histamin den Stoffwechsel des Nervengewebes beeinflusst. Den Angriffspunkt des Histamins auf den Stoffwechsel vermochten wir mit Hilfe seiner Antagonisten, der Antihistamine, feststellen. Von den letzteren stellte sich nämlich heraus, dass sie die Atmung der grauen Hirnsubstanz — bei den Cytochromen angreifend — hemmen, dass sie aller Wahrscheinlichkeit nach mit dem dreiwertigen Cytochrom-*b* Komplexe bilden, und so dessen Reduktion hemmen (1, 2, 3). Die durch Antihistamine verursachte Atmungshemmung kann mit Histamin aufgehoben werden. Wir stellten fest, dass Histamin und Antihistamin mit Häminen leicht Komplexe bilden, und dass in diesen Komplexen Histamin und Antihistamin gegeneinander ausgewechselt werden können. Die Bindung dürfte an dem zentralen Eisenatom des Hämins stattfinden (3).

Wir suchten weiter zu erfahren, auf welche Weise das Histamin, bzw. die Antihistamine nach ihrem Eintritt in ein solches Schwermetallproteinmolekül dessen biologische Eigenschaften verändern. Hierdurch wäre nämlich ein tieferer Einblick in die Pathochemie der Histaminschäden zu gewinnen. In Anbetracht dessen, dass eine Komplexbildung nur bei den unlöslichen, strukturgebundenen Cytochromen, den Anzeichen nach beim Cytochrom-*b*, zustandekommt, ist auch die biologische Eigenschaft der fraglichen Cytochrom-Histamin-, bzw. Cytochrom-Antihistaminkomplexe nicht studierbar.

Seit *Stern* (4) und *Langenbeck* (5) wissen wir, dass die auch im tierischen Organismus vorkommenden N-Basen mit Hämin sehr leicht Komplexe bilden. Ein Teil dieser Komplexe lässt eine auffallende Katalasewirkung erkennen. In der Reihenfolge steht hier an erster Stelle der Histamin-Häminkomplex mit der stärksten Katalasewirkung. Das strukturell dem Histamin nahestehende Histidin dagegen setzt die vorhandene Katalasewirkung des Hämins herab.

In unseren Versuchen wurde die Katalasewirkung von Antihistamin-Häminkomplexen gegenüber der von Histamin-Häminkomplexen untersucht.

Methodik

5 mg Häminchlorid, in alkalischem Medium gelöst + 2 äquimolar. Histamin-, bzw. Pyribenzamin in 45 ml Phosphatpuffer (pH 7.3 ; 0,0666 mol.) suspendiert. H_2O_2-Endkonzentration: 0,02 m. Temperatur: 0° C. Alle drei Minuten wurden dem Versuchsgemisch 5 ccm entnommen, und der H_2O_2-Gehalt jodometrisch bestimmt. Der Peroxydgehalt wurde in N/50 $Na_2S_2O_3$ ml ausgedrückt.

Wie aus *Abb.* 1 hervorgeht, wird die vorhandene, schwache Katalasewirkung des Hämins durch das mit ihm Komplexe bildende Histamin erheblich gesteigert. Die Kata-

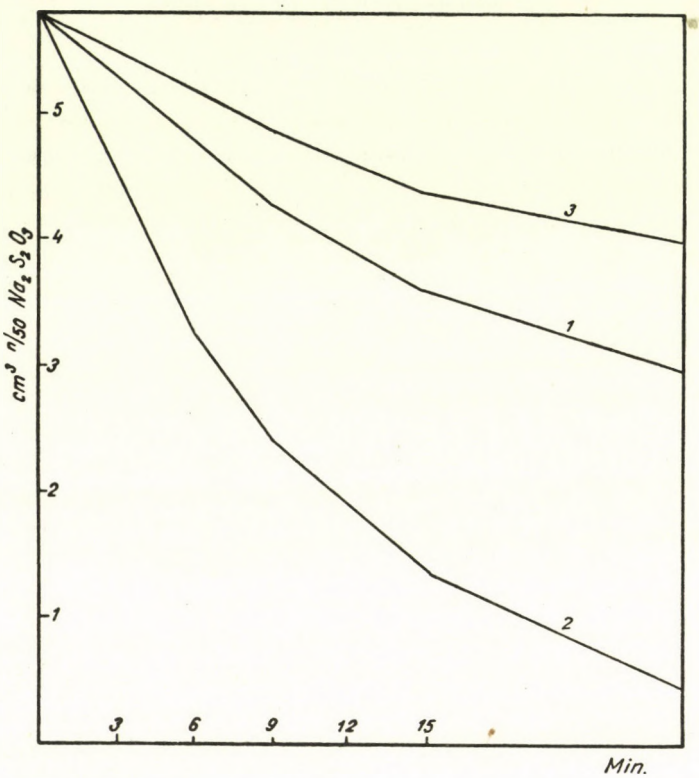


Abb. 1. Die Katalaseaktivität von Histamin- und Antihistamin-Häminkomplexen
1=Hämatin ; 2=Histamin-Parahämatin ; 3=Pyribenzamin-Parahämatin

lasewirkung des Pyribenzamin-Parahämatins dagegen ist schwächer als die ursprüngliche Katalasewirkung des Hämins.

Im folgenden Experiment untersuchten wir, auf welche Art die Antihistamine die starke Katalasewirkung des Histamin-Parahämatins beeinflussen. Zu diesem Zweck versetzten wir das obige Histamin-Parahämatingemisch mit 5 äquimol. Pyribenzamin.

Abb. 2 zeigt, dass das Pyribenzamin die Katalasewirkung des Histamin-Parahämatins auf das Niveau des reinen Pyribenzamin-Parahämatins herabsetzte. Wurde aber das Pyribenzamin-Parahämatingemisch mit 5 äquimol. Histamin versetzt, so trat statt der Katalasewirkung des Pyribenzamin-Parahämatins eine dem Histamin-Parahämatin entsprechende Katalaseaktivität in Erscheinung.

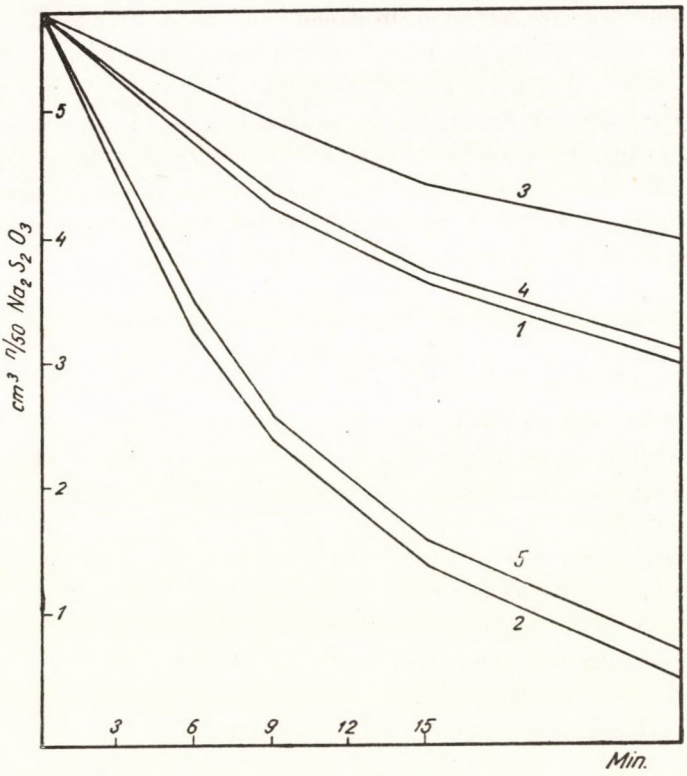


Abb. 2. Die Katalaseaktivität von Histamin- und Antihistamin-Häminkomplexen
1 = Hämatin ; 2. = Histamin-Parahämatin ; 3 = Pyribenzamin-Parahämatin ;
4 = Histamin-Parahämatin + Pyribenzamin ; 5 = Pyribenzamin-Parahämatin + Histamin

Diskussion

Diese Versuche erbringen den unzweifelhaften Beweis, dass das Histamin, wenn es mit dem Häminmolekül eine Bindung eingeht, dessen biologisches Verhalten weitgehend verändert und es katalasewirksam macht. Die Katalaseaktivität des Histamin-Häminkomplexes kann durch seine Antagonisten, die Antihistamine, aufgehoben werden. Auf Grund dessen ist anzunehmen, dass das unter pathologischen Verhältnissen angereicherte Histamin, durch Bindung an die prosthetische Gruppe der Cytochrome, deren biologisches Verhalten wesentlich verändert.

Ausser seiner Koppelung mit den Cytochromen, kann das Histamin auch mit dem unter pathologischen Umständen von den Fe-Proteinen abgespaltenen, freien Hämin eine Bindung eingehen. Von den Histamin-Häminkomplexen aber haben wir festgestellt, dass sie stark katalasewirksam sind. Jetzt fragt sich nur noch, inwiefern derartig stark katalasewirksame Stoffe den Gewebestoffwechsel schädigen können. Von den katalasewirksamen Stoffen wissen wir, dass sie alle

jene Oxydationsvorgänge hemmen, in denen das intermediär gebildete Peroxyd eine wichtige Rolle spielt. Ein solcher Oxydationsvorgang ist unter anderem auch die Oxydation der ungesättigten Fettsäuren.

Auf Grund solcher Überlegungen beabsichtigen wir in weiteren Untersuchungen die Frage zu klären, auf welche Weise Histamin-, bzw. Antihistamin-Häminkomplexe einen Oxydationsmechanismus beeinflussen, in dem das Peroxyd eine wichtige Rolle spielt. In erster Linie soll ihre Wirkung auf die Oxydation der ungesättigten Fettsäuren geprüft werden.

Zusammenfassung

1. Histamin und Antihistamine bilden mit dem Hämin leicht Komplexe. Histamin steigert die sonst schwache Katalasewirkung des Hämins in erheblichem Masse. Die Antihistamine dagegen setzen die ursprüngliche Katalasewirkung des Hämins herab.

2. Antihistamine, in entsprechender Konzentration verabreicht, heben die Katalasewirkung der Histamin-Häminkomplexe auf.

3. Diese Versuche erbringen einen weiteren Beweis dafür, dass die Histamin-Antihistaminwirkung an den Schwermetallproteinen stattfindet, und dass das Histamin nach einem Eintritt in das Schwermetallkatalysatorenmolekül dessen biologisches Verhalten weitgehend verändern kann.

LITERATUR

1. *Huszák, I.* u. *Domonkos, J.:* Acta Allergologica **IV**, 47 (1951).
2. *Huszák, I.* u. *Domonkos, J.:* Acta Allergologica **IV**. 53 (1951).
3. *Domonkos, J.* u. *Huszák, I.:* Acta Physiol. Hung. **4**, 25. (1953).
4. *Stern, K. G.:* Physiol. Chemie, 215, 35 (1933).
5. *Langenbeck, W., Hutschenreuter, R.* u. *Rottig, W.:* Ber. Chem. Ges. **65**, 1750 (1932).

О КАТАЛАЗНОМ ДЕЙСТВИИ КОМПЛЕКСОВ ГИСТАМИНА- И АНТИГИСТАМИНА-ГЕМИНА

Я. Домонкош и И. Хусак

Институт мозга медицинского университета, Сегед.

Резюме

1. Гистамин и антигистамин легко образуют комплексы с гемином. Гистамин в значительной степени повышает слабое каталазное действие гемина. Антигистамины же снижают первоначальное каталазное действие гемина.

2. Антигистамины, дозированные в соответствующей концентрации прекращают каталазное действие комплексов гистамина-гемина.

3. Эти опыты предоставляют дальнейшее доказательство того, что действие гистамина-антигистамина происходит у протеино-соединениях тяжелых металлов, и что гистамин, вступив в состав молекулы катализатора, содержащего тяжелыт металлы может в значительной степени изменять биологическое поведение последней.

ÜBER DIE POLYSACCHARIDE DES FIBRINOGENS UND FIBRINS

Von

ST. SZÁRA und D. BAGDY

BIOCHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen: am 27. Januar 1953)

Unsere Kenntnisse über die Proteine, die in der Blutgerinnung eine Rolle spielen, haben sich im Laufe der letzten Jahren wesentlich vermehrt. So wurde unter anderem der Aminosäuregehalt des Fibrinogens und Fibrins (1) und deren elektrophoretische und andere physikalisch-chemische Eigenschaften (2) genau untersucht. In der Literatur gibt es nur wenige Hinweise auf den Polysaccharidgehalt dieser Proteine. *Seibert*, *Pfaff* und *Seibert* (3) beschrieben bei Untersuchung des Polysaccharidgehaltes der elektrophoretisch getrennten Plasmaeiweisskörper, dass im Fibrinogen 1% Polysaccharid nachweisbar ist. Diese Angabe kann aber wegen der nicht völligen Reinigung des Präparates nicht bewertet werden.

Wir haben bei der Aminosäureanalyse von Fibrinhydrolysaten beobachtet, dass diese eine starke Molisch-Reaktion geben. An Hand dieser Beobachtung wurden folgende Fragen aufgeworfen: Ist der nachgewiesene Zucker — in Form von Polysaccharid — ein integranter Bestandteil des Fibrins, oder nur eine leicht trennbare Verunreinigung? Welche sind seine Komponenten? Ist dieser Zucker auch in Fibrinogen vorzufinden? Kann man einen Unterschied zwischen den Polysacchariden des Fibrinogens und Fibrins aufweisen?

Zur Klärung der Fragen haben wir aus Plasma von Rindern und anderen Säugetieren mittels unseren modifizierten Verfahrens (4) hochgereinigtes Fibrinogen hergestellt.

Nach der Adsorption mit $BaSO_4$ (um das Prothrombin zu entfernen) wurde das Fibrinogen bei 0° C mit Alkohol gefällt. Der alkoholische Niederschlag wurde in physiologischer NaCl-Lösung gelöst, dann das Fibrinogen durch 0,2 Sättigung mit Ammonsulfat gefällt. Der Niederschlag wurde in phys. NaCl gelöst und das Fibrinogen nach entsprechender Verdünnung dieser Lösung beim isoelektrischen Punkt bei 0° C abgeschieden. Das Auflösen wurde durch Zugabe einiger Tropfen von 12%-iger Ammoniumhydroxid-Lösung durchgeführt. Nun wurde die Lösung gegen 2%-ige NaCl ammonia- und sulfatfrei dialysiert. In der so erhaltenen Lösung ist 95—98% des Gesamteiweisses durch Thrombin gerinnbar.

Die Umwandlung des Fibrinogens zu Fibrin durch Rinderthrombin (Hoffmann-La Roche und Richter) wurde unter speziellen Bedingungen (5) durchgeführt, damit sie vollständig sei und andere Eiweissmoleküle aus dem Fibrinnetz leicht entfernt werden können. Nach der Umwandlung wurde das Fibrin gesammelt, mit Alkohol und Äther mehrmals gewaschen und im Vakuum-Exsiccator über $CaCl_2$ getrocknet. Das auf diese Weise dargestellte Fibrin kann als analytisch rein betrachtet werden, weil es von den im Serum vorhandenen Proteinen und anderen Verunreinigungen im Laufe der Herstellung befreit wurde. Da das so gereinigte Fibrin eine sehr starke Molisch-Reaktion zeigte, so kann der Zucker nicht als Verunreinigung, sondern als das Polysaccharid des Fibrins betrachtet werden.*

Zu den weiteren Untersuchungen haben wir das aus den verschiedenen Säugetieren dargestelltes, gereinigtes Fibrin mit N/2 Schwefelsäure in folgender Weise hydrolysiert. 0,3—0,4 g getrocknetes Fibrin wurde mit 20 ml N/2 Schwefelsäure unter Rückfluss auf dem Wasserbade 6—8 Stunden lang gekocht. Nach unserer Erfahrung ist diese Zeit für die vollständige Hydrolyse des Polysaccharid genügend. Ein Teil der Lösung wurde mit $Ba(OH)_2$ neutralisiert und nach Filtrieren mittels Papierchromatographie untersucht. Der übrige Teil der Lösung wurde mit Natronlauge neutralisiert, mit destilliertem Wasser auf das doppelte Volum aufgefüllt und kolorimetrische Bestimmungen aus je 2 ml durchgeführt.

Wir haben die papierchromatographischen Untersuchungen aus einem, 1 mg Fibrin entsprechenden Hydrolysate nach der Methode von Partridge (6) mit Butanol-Essigsäure auf Macheray-Nagel 214 Papier ausgeführt. Die Chromatogramme wurden nach dem ersten Butanol-Essigsäurelauf noch einmal mit Butanol-Essigsäure chromatographiert. Nach der Trocknung entwickelten wir die Chromatogramme teils mit 0,1%-igem Ninhydrin, teils mit Anisidinphosphat Reagent (7) für Zucker.

Auf der 1. Abbildung ist das Chromatogramm des Rinderfibrins zu sehen. Es gelang drei reduzierende Stoffe zu trennen, die mit Mannose, Galactose und Glucosamin parallel laufen. Der deformierte Fleck des Glucosamins wies darauf hin, dass die in grosser Menge anwesenden Aminosäuren — wahrscheinlich durch Aussalzung — es verhinderten, dass das Glucosamin den ihm entsprechenden Rf Wert besässe. Darum verwendeten wir unter den Kontroll-Zuckern eine zuckerfreie Aminosäuremischung von gleicher Zusammensetzung, die aus dem ursprünglichen Fibrinhydrolysat durch Peroxidbehandlung gewonnen wurde.

* Während der Zusammenstellung unserer Resultate erschien *B. Consden*'s und *W. N. Stanier*'s Mitteilung (Nature **169**, 783, 1952), in welcher sie im menschlichen Fibrin ein Polysaccharid mit Papierionophorese nachgewiesen haben. Sie führten die Reinigung des Fibrins auf eine andere Weise durch: Nach der Gerinnung des Fibrinogens aus Zitratplasma durch Thrombin wurde das Fibrin in Monochloressigsäure gelöst, dann mit Trichloressigsäure gefällt. In dem auf diese Weise gewonnenen, gereinigten Fibrin wurden dieselben Zucker in ungefähr gleicher Menge gefunden, wie wir es auch nachgewiesen haben.

In diesem Falle wird der Fleck des Glucosamins ebenso deformiert und nimmt solche Rf Werte auf, welche im ursprünglichen Fibrinhydrolysat zu finden waren.

Wir erhielten dasselbe Resultat, als wir das Fibrin anderer Säugetiere chromatographierten und konnten die Ergebnisse auch mit zweidimensioneller Chromatographie bestätigen.

Auf Grund der chromatographischen Untersuchungen gebrauchten wir zur quantitativen Bestimmungen der Zucker kolorimetrische Methoden. So wurde der Hexosegehalt (Galactose und Mannose zusammen) mit der quantita-

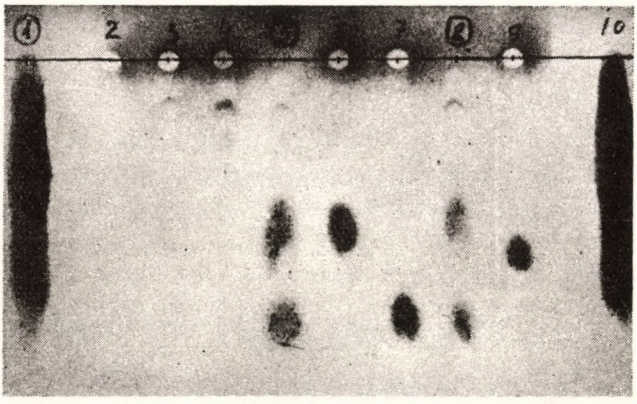


Abb. 1. Die 1. und 10. Kolonnen wurden durch 0,1%-igem Ninhydrin, die 2.—9. Kolonnen durch Anisidin-Phosphat Reagent entwickelt. 1., 5., 8. Kolonne: Fibrinhydrolysate ohne Behandlung 2., 3., 4., 6., 7., 9., 10. Kolonne: Fibrinhydrolysate mit H_2O_2 behandelt, auf denen auch die folgenden Kontroll-Zucker aufgetropft wurden: 3., 4. Kolonne: Glucosamin. 6. Kolonne: Galactose. 7. Kolonne: Mannose. 9. Kolonne: Glucose

tiven Form der Molisch-Reaktion (8), sowie mit der Orzin-Reaktion (9), der Glucosamingehalt mit der Elson-Morganschen (9) Methode bestimmt. Die Eichungskurve wurde mit einer Mischung gleicher Mengen von Galactose und Mannose, resp. Glucosamin aufgenommen. Die Messungen wurden mit dem Pulfrichschen Stufenfotometer, mit Filter S 57., resp. S 50. durchgeführt. In der Tabelle I haben wir die Daten der Fibrine verschiedener Säugetiere angegeben.

Wie aus der Tabelle I ersichtlich, besitzen die verschiedenen Fibrine etwa den gleichen Hexose- (cca 1,5%) und Glucosamingehalt (cca 0,5%). Das Glucosamin/Hexose Verhältnis zeigt bei den verschiedenen Tierarten keinen bewertbaren Unterschied.

Weiterhin untersuchten wir ob dieses Polysaccharid auch im Fibrinogen vorzufinden, bzw. ob ein Unterschied zwischen dem Polysaccharid des Fibrinogens und des daraus dargestellten Fibrins nachweisbar sei.

Aus diesem Grunde dialysierten wir 95—98% reines Rinder- und Kaninchenfibrinogen gegen destilliertes Wasser vollständig aus und die gefällten Proteine wurden mit Alkohol und Äther gewaschen und schliesslich im Vakuum-Exsicca-

TABELLE I

Hexose- und Glucosamingehalt des Polysaccharids aus Fibrin verschiedener Säugetiere in % der Trockensubstanz

Fibrin	Hexose n* %	Glucosamin n* %	Glucosamin / Hexose Verhältnis
Mensch	2 1,73±0,03	2 0,55±0,01	0,32
Rinder.....	4 1,33±0,04	2 0,54±0,01	0,40
Pferde	3 1,49±0,04	3 0,58±0,04	0,39
Schaf	3 1,13±0,06	4 0,48±0,04	0,42
Kaninchen	4 1,66±0,02	2 0,60±0,02	0,36

* Zahl der Bestimmungen.

tor über $CaCl_2$ getrocknet. Aus diesem Material haben wir die Bestimmungen auf die gleiche Weise durchgeführt, wie wir es beim Fibrin beschrieben haben.

Bei papierchromatographischen Untersuchungen zeigte sich kein Unterschied zwischen Fibrinogen und Fibrin. Mit kolorimetrischen Methoden gelang es, wie aus Tabelle II ersichtlich, quantitative Differenzen nachzuweisen.

TABELLE II

Hexose- und Glucosamingehalt des Polysaccharids aus Fibrinogen und Fibrin in % der Trockensubstanz

Protein	Hexose n* %	△H**	Glucosamin n* %	△G***	Glucosamin / Hexose Verhältnis
Rinder					
Fibrinogen	4 1,64±0,02		2 0,56±0,02	∅	0,34
Fibrin	4 1,33±0,04	18,9	2 0,54±0,01		0,40
Kaninchen					
Fibrinogen	4 1,98±0,03		2 0,59±0,03	∅	0,30
Fibrin	4 1,66±0,02	16,1	2 0,60±0,02		0,36

* Zahl der Bestimmungen.
** Differenz in % der Hexose.
*** Differenz in % des Glucosamin.

Es ist zu beobachten, dass im Rinderfibrin 18,9% weniger und im Kaninchenfibrin 16,1% weniger Hexose aufzufinden ist, als in den entsprechenden Fibrinogenen, dagegen findet man im Glucosamingehalt keine Änderung. Diese Beobachtung ist schon deswegen beachtungswert, weil es nach allgemeiner Meinung zwischen Fibrin und Fibrinogen — ausser der Zahl der Glyzin-Endgruppen (10) — keinen wesentlichen greifbaren chemischen Unterschied gibt.

Unsere weiteren Untersuchungen zur ausführlichen Klärung der obigen Fragen sind im Gange.

LITERATUR

1. *Bailey, K.:* Adv. in Protein Chem. **1,** 311 (1944).
Albanez, A. A., Barnes, T. M.: J. Biol. Chem. **157,** 613 (1945).
2. *Schmied, J.:* Die Blutgerinnung in Theorie und Praxis. W. Maudrich. Wien. S. 299 (1951).
Haurowitz, F.: Chemistry and Biology of Proteins. Academic Press Inc., Publ. S. 152, 156 (1950).
3. *Seibert, F. B., Pfaff, M. L., Seibert, M. V.:* Arch. of Biochem. **18,** 279 (1948).
4. *Bagdy, D.:* Acta Physiol. Hung. **2,** 18 (1949).
5. *Morrison, P. R.:* J. Am. Chcm. Soc. **69,** 2723 (1947).
6. *Partridge, S. M.:* Biochem. J. **42,** 240, (1948).
7. *Mukherjeje, S., Srivastava, H. C.:* Nature **169,** 330 (1952).
8. *Bamann—Myrbäck:* Die Methoden der Enzymforschung I. 1082. (1940).
9. *Rimington, C.:* Biochem. J. **34,** 931 (1940).
10. *Bailey, K., Bettelheim, F. R., Lóránd, L., Middlebrook, W. R.:* Nature, **167,** 233 (1951).

О ПОЛИСАХАРИДЕ ФИБРИНОГЕНА И ФИБРИНА

И. Сара и Д. Багди

Биохимический институт медицинского университета, г. Будапешт

Резюме

При анализе аминокислот гидролизатов фибрина, авторы наблюдали, что гидролизаты проявляют весьма сильную реакцию Молиша. В связи с этим возникли следующие вопросы: представляет-ли собой выявленный сахар только загрязнение, или же он является составной частью молекулы фибрина в виде полисахарида?. Какие его компоненты? Можно-ли его выявить также и в фибриногене, и наконец, существует-ли разница между полисахаридом фибрина и полисахаридом фибриногена?

Из высоко очищенного фибриногена рогатого скота и других млекопитающих (человека, лошади, овцы и кролика), а также из фибрина, полученного из фибриногена под действием тромбина, авторы выявили после кислотного гидролиза, при помощи бумажно-хроматографического анализа три редуцирующих сахара: маннозу, галактозу и глюкозамин. Фибрины различнных видов млекопитающих содержат эти три редуцирующих сахара в приблизительно одинаковой пропорции. По количественным колориметрическим определениям фибриноген содержит значительно больше гексозы, чем соответствующий фибрин, при приблизительно одинаковом содержании глюкозамина. Ввиду того, что эта разница выявлена в случае ряда видов фибрина, авторы того мнения, что полисахариды играют роль при преобразовании фибриногена в фибрин. Авторы продолжают свои исследования в этом направлении.

ÜBER DIE AKKUMULATION DER KALIUMIONEN DURCH MENSCHLICHE BLUTKÖRPERCHEN

Von

F. B. STRAUB

MEDIZINISCH-CHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen: am 9. Februar 1953)

Es konnte auf Grund zweier experimenteller Beweise gefolgert werden, dass die Blutkörperchen ihren K-Überschuss durch ständige Akkumulation aufrechterhalten. Erstens konnte vielfach nachgewiesen werden, dass irgendeine Hemmung oder Vernichtung des Stoffwechsels einen Konzentrationsausgleich zur Folge hat. Zweitens zeigen die Messungen des K-Austausches mit Hilfe des radioaktiven K-Isotops, dass pro Stunde und pro Liter Zellen 1,6 mM K ausgetauscht werden, d. h. dass soviel K in der Richtung des Gradienten verloren geht und dass wieder ebensoviel gegen den Gradienten aufgenommen wird. Keine dieser Methoden erwies sich aber als geeignet, um einen näheren Einblick in den Mechanismus dieser Akkumulationsprozesse zu gewähren. Obwohl verschiedene Theorien entwickelt wurden, ist diese Frage bisher überhaupt nicht gelöst. Die von uns hier beschriebene Methode gestattet, diese Erscheinung *kinetisch* zu untersuchen, was für die weitere Erforschung des Mechanismus unentbehrlich scheint.

Székely, *Mányai* und *Straub* (1) haben gefunden, dass menschliche Blutkörperchen nach partieller Hämolyse ihre Kationimpermeabilität bewahren. Werden die Zellen mit *wenig* Wasser bei 0° hämolysiert und stellt man dann die Isotonie durch Zugabe der entsprechenden Menge KCl oder NaCl her, so erhält man sogenannte »revertierte Zellen«, die im Zellinneren K- oder Na-Ionen enthalten. Solche Zellen verlieren das K oder Na durch Waschen nicht mehr. Es wurde nachgewiesen, dass die Zellmembrane im hypotonischen Zustand meistens erhalten bleiben, dass sie sich aber während dieser Hypotonie für einige Ionen, wie K^+, Na^+ und Phosphat — vorübergehend — als permeabel erweisen.

Diese Beobachtung gestattete uns eine experimentelle Untersuchung der Ionenakkumulation. Es wurde ein System geschaffen, in welchem mehr Na- als K-enthaltende menschliche Blutkörperchen — »revertierte Na-Zellen« dargestellt wurden. Wenn diese in einer isotonischen Flüssigkeit suspendiert wurden, so konnten sie bei 37° *gegen* den Konzentrationsgradienten mehrere Stunden lang K anhäufen.

Methoden

Menschliches Blut wird defibriniert, durch Baumwolle filtriert, wonach die Zellen abzentrifugiert werden. Der Zellbrei wird auf O° gekühlt und mit 1,2 Volumen eiskaltem Wasser schnell verrührt. Die Mischung erscheint lackfarbig. Nach 15 Minuten gibt man 1/9 Volumen (des zugesetzten Wassers) 9% NaCl bei, worauf sich die Mischung trübt. Die »revertierten Zellen« werden abzentrifugiert und mit der gleichen Menge 0,9% NaCl ein- oder zweimal gewaschen. Sie werden dann in einer isotonischen Lösung suspendiert, so dass der scheinbare Hämatokritwert zwischen 40—60% liegt. Wenn es nötig war, ionisierte Substanzen ausser NaCl in die Zelle einzuschliessen (siehe unten), so wurden diese mit dem zur Hämolyse dienenden Wasser vermischt, nachdem ihre isotonischen Lösungen entsprechend (d. h. durch Zugabe von 1,2 Volumen Wasser) verdünnt wurden.

Die Suspension der derart präparierten Zellen wurde bei 37° inkubiert. Nach je 30 Minuten wurde eine kleine Probe genommen, zentrifugiert und aus der überstehenden Flüssigkeit K mit dem Flammenphotometer bestimmt. Milchsäure wurde mit der Methode von *Barker* und *Summerson* (2), ATP mit unserer spezifischen Mikromethode (3) bestimmt. Der scheinbare Hämatokritwert betrug meistens 40—60%. — Fruktosediphosphorsäure wurde enzymatisch dargestellt und gereinigt.

Ergebnisse

Werden die Zellen *ohne Substrat* in der oben beschriebenen Weise behandelt und dann in einer isotonischen Salzlösung (0,147 *M* NaCl und 0,08 *M* $KHCO_3$)

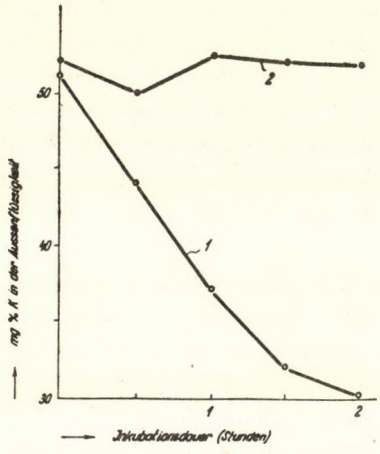


Abb. 1. Kaliumaufnahme von »revertierten Na-Zellen«
Kurve 1.: In Gegenwart von 100 mg% Fruktosediphosphat hämolysierte Zellen.
Kurve 2.: Ohne Zusatz von Substrat hämolysierte Zellen. Inkubation bei 37°.

bei 37° inkubiert, so findet man keine wesentliche Änderung der Verteilung des Kaliums. (S. Abb. 1., Kurve 2).

Führt man alle oben beschriebenen Manipulationen in Gegenwart von 100 mg% *Glukose* aus und inkubiert man die Zellen in Gegenwart von Glukose bei 37°, so findet man variable Ergebnisse. In einigen Fällen findet eine Akkumulation des K durch die Zelle (d. h. ständiges Abnehmen des Aussenkaliums)

statt, wie im Exp. 1 der Tab. I. In den meisten Fällen erfolgt aber nur eine kleine Akkumulation in der ersten halben Stunde, worauf sie dann vollständig aufhört. (Exp. 2 der Tab. I.) Die Milchsäurebestimmungen beweisen, dass es in den Fällen, wo keine Akkumulation stattfindet, keine Glykolyse mehr gibt, wird aber Milchsäure gebildet, so findet man eine ständige Akkumulation.

Wird aber an Stelle der Glukose während des hypotonischen Zustandes 100 mg% *fruktosediphosphorsaures Na* den Zellen zugegeben und wäscht man die »revertierten Zellen« mit einer isotonischen Salzlösung und inkubiert man sie in derselben Salzlösung* (0,147 *M* NaCl und 0,08 *M* $KHCO_3$), so findet man eine ständige, mehrere Stunden andauernde Akkumulation der K-Ionen. (S. *Abb*, 1. Kurve 1, sowie Exp. 1—3 der Tab. I.)

TABELLE I

*K-Akkumulation und Milchsäurebildung in »revertierten Na-Zellen«***

Exp. 1

Zusatz	100 mg % Glukose			100 mg % Fruktose-diphosphat		
Dauer der Inkubation (Minuten):	0	60	120	0	60	120
Gefunden mg% K in der Aussenflüssigkeit	48,4	43,2	38,7	50,5	39,9	35,3
Berechnet mg% K in den »Zellen«	89,3	—	109	82,8	—	105
K-Zunahme mg pro 100 ml »Zellen«	—	—	+ 19,7	—	—	+ 22,5
Milchsäure gefunden mg/ml Suspension	0,039	0,177	0,219	0,048	0,195	0,210

Exp. 2

Zusatz	100 mg % Glukose			100 mg % Fruktose-diphosphat		
Dauer der Inkubation (Minuten):	0	60	120	0	60	120
Gefunden mg% K in der Aussenflüssigkeit.....	47,3	48,1	47,1	50,8	45,7	39,3
Berechnet mg% K in den »Zellen«	74	—	71,6	65,6	—	75,1
K-Zunahme mg pro 100 ml »Zellen«	—	—	(—2,4)	—	—	+ 9,5
Milchsäure gefunden mg/ml Suspension	0,030	0,078	0,078	0,048	0,102	0,180

* Zugabe von Fruktosediphosphat *nach* der Herstellung der Isotonie ist überflüssig da die Zellen im *isotonischen* Zustande dafür impermeabel sind. Während der Hypotonie ist ein Teil des Fruktosediphosphats in die Zellen geraten, dieser Anteil kann später mit der Salzlösung nicht ausgewaschen werden.

** Wahrscheinlich werden auch geschädigte Zellen, die für K und Na leicht permeabel sind, im Hämatokritwert mitbestimmt. Somit sind die auf Grund des scheinbaren Hämatokritwertes berechneten Werte für Zellkalium stets kleiner als die tatsächlichen. — Der Hämatokritwert wurde zu Beginn wie auch am Ende der Inkubation bestimmt.

Exp. 3

Zusatz	100 mg % Fruktose-diphosphat			100 mg % Fruktose-diphosphat + 0,0025 M Arsenat		
Dauer der Inkubation (Minuten):	0	60	120	0	60	120
Gefunden mg% K in der Aussenflüssigkeit.....	45,5	41,6	38,9	50,8	49,7	49,0
Berechnet mg% K in den »Zellen«	53,7	58,2	61,5	52,8	53,6	53,8
K-Zunahme mg pro 100 ml »Zellen«	—	—	+ 7,8	—	—	+ 1,0
Milchsäure gefunden mg/ml Suspension	0,052	0,102	0,135	0,084	0,150	0,196
ATP gefunden mg/ml Suspension	0,040	0,060	—	0,00	0,00	—

In den weiteren Experimenten wurde die Fermentation mit Fruktosediphosphat aufrechterhalten. Es gelang nun sehr leicht zu zeigen, dass nicht die Fermentation selbst oder einer ihrer Einzelprozesse für die Akkumulation nötig ist, sondern nur die dadurch erzeugten makroergischen Phosphatverbindungen. Dies ist ganz klar aus den Ergebnissen zu sehen, die wir durch Zugabe von *Arsenat* gewonnen haben. Arsenat wird durch die menschlichen Blutkörperchen (ebenso wie Phosphat) nur sehr langsam durchgelassen. Wird aber Arsenat in dem oben beschriebenen hypotonischen Zustande den Zellen hinzugefügt, so wird es fast gleichmässig zwischen den Zellen und der Aussenflüssigkeit verteilt. Wegen der wenn auch schwachen Permeabilität für Arsenat haben wir dieselbe Konzentration Arsenat auch den Wasch- und Suspensionflüssigkeiten zugesetzt. Exp. 3 der Tab. I zeigt, dass in Gegenwart von 0,0025 *M* Arsenat die Milchsäurebildung aus Fruktosediphosphat sogar gesteigert wird, dass aber trotzdem keine K-Akkumulation erfolgt. Dagegen ist in den arsenathaltigen »Zellen« schon zu Beginn der Inkubation kein ATP vorhanden.

Diskussion

Eingangs sei angeführt, warum Fruktosediphosphat als Gärungssubstrat benützt wurde. Die Glykolyse der Blutkörperchen geht nur in jenem Falle vor sich, wo ATP vorhanden ist. Eine kleinere Konzentration des Fluorids, welche die Gärung anderer Zellarten — die eine grössere Reserve an ATP besitzen — nur noch um weniger als 50% hemmt, verursacht in 45—60 Minuten einen völligen Stillstand der Glykolyse, da während dieser Zeit alles ATP verschwindet (5). Das Ausschalten der ATP-Generation schaltet also unbedingt auch die Glykolyse aus. Das ist aber nicht der Fall, wenn man von Fruktosediphosphat ausgeht, denn in diesem Falle ist keine einleitende Phosphorylierung mehr nötig.

Während der beschriebenen Methode der Darstellung der »revertierten Na-Zellen« findet ferner eine leichtere oder schwerere Schädigung der Zellen statt. Diese Schädigung führt eventuell zur Aktivierung der normalerweise inaktiven ATPase des Blutkörperchens [siehe (4) und (5)]. Damit wird das ATP hydrolytisch gespalten, dies führt dann zum Stillstand der Hexokinasereaktion und die Glykolyse kann nicht mehr vor sich gehen (wie in Exp. 2, Tab. I). Dagegen wird die Fermentation aus Fruktosediphosphat durch die Aktivierung der ATPase überhaupt nicht gestört.

Die rechnerische Analyse aller Versuche zeigt (siehe Tab. I), dass in unseren Experimenten tatsächlich eine Akkumulation des Kaliums stattfindet. Mit der Ausnahme des Versuches, wo Arsenat vorhanden ist, ist die Akkumulation mit einer Milchsäurebildung, d. h. mit dem Stoffwechsel verbunden.

Aus dem Obengesagten ist es nun ganz klar geworden, dass nicht die Gesamtheit der Glykolyse oder irgendeine ihrer Einzelreaktionen für die Akkumulation des Kaliums verantwortlich ist. Für die Akkumulation ist nur das durch die Glykolyse erzeugte Adenosintriphosphat nötig. Wird die Phosphorylierung durch Arsenat unterbunden, so bleibt die Akkumulation völlig aus, obwohl alle Vorgänge der Glykolyse bis zur Bildung von Milchsäure vor sich gehen.

Obwohl im Arsenatversuch nur Fruktosediphosphat und keine Glukose zugegeben wurde, ist es dennoch möglich, dass das Fruktosediphosphat als Verunreinigung eine kleine Menge von freier Hexose enthielt. In diesem Falle könnte man sich vorstellen, dass die Hexokinasereaktion mit der Akkumulation verbunden ist und dass Arsenat die Akkumulation dadurch hemmt, dass es durch Ausschalten des ATP die Hexokinasereaktion vernichtet. Wäre dies der Fall, so könnte man erwarten, dass die Akkumulation des Kaliums durch Zugabe von Glukose + Fruktosediphosphat gefördert wird. Da dies nicht zu beobachten war, so haben wir die Möglichkeit einer Teilnahme der Hexokinase im Anhäufungsprozess ausgeschlossen.

Es wurde von mehreren Autoren [z. B. (6)] auf die merkwürdige Übereinstimmung der Geschwindigkeit des Glukoseverbrauchs und der Kaliumakkumulation hingewiesen. Bei 37° C verbrauchen 1 Liter menschliche Blutkörperchen pro Stunde 1,6 m*M* Glukose und häufen (während eines dynamischen Gleichgewichtes unter normalen Verhältnissen) eben 1,6 m äquivalentes K an. Daraus kann man auf einen engen Zusammenhang zwischen Glykolyse und K-Akkumulation schliessen. Die Milchsäurebildung in unseren »revertierten Na-Zellen« ist kleiner als in den intakten Blutkörperchen, da ein Teil der Enzyme und Kofaktoren während der Hämolyse entfernt wird. In diesen revertierten Zellen wurde nicht das oben geschilderte stöchiometrische Verhältnis gefunden, in einem Falle war sogar das Verhältnis der gebildeten Milchsäure zum akkumulierten Kalium kleiner als 1 : 5 (anstatt des erwarteten 2 : 1).

Die nächste Aufgabe besteht nun in der Verfolgung der weiteren Reaktionen, die unter Verwertung des ATP zur Akkumulation des Kaliums führen.

Es sei hier *I. Sztehlo* und *E. Horváth* der beste Dank für ihre wertvolle Hilfe ausgesprochen.

Zusammenfassung

1. Es wurde eine Methode ausgearbeitet, mit deren Hilfe Na-haltige menschliche Blutkörperchen dargestellt werden können, die bei 37° gegen einen Konzentrationsgradienten K anhäufen. Damit kann die biologische Kaliumakkumulation *kinetisch* untersucht werden.

2. Die Blutkörperchen akkumulieren K auf Kosten des vorhandenen ATP. Die Akkumulation ist mit den glykolytischen Prozessen nicht direkt verbunden.

LITERATUR

1. *Székely, M., Mányai, S., Straub, F. B.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 571 (1952).
2. *Barker, S. B., Summerson, W. H.:* J. Biol. Chem. **138**, 535 (1941).
3. *Kramer, M., Pettkó, E., Straub, F. B.:* Kísérletes Orvostudomány **1**, 114 (1949).
4. *Straub, F. B.:* Magyar Tudományos Akadémia Orvosi Tudományok Osztályának Közleményei **3**, 31 (1952).
5. *Székely, M., Mányai, S., Straub, F. B.:* Acta Physiol. Hung. **4**, 31, (1953).
6. *Weller, J. M., Taylor, I. M.:* Ann. intern. Med. **33**, 607 (1950).

НАКОПЛЕНИЕ K В ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЭРИТРОЦИТАХ

Ф. Б. Штрауб

Медицинско-химический институт медицинского университета, Будапешт

Резюме

На основе ранее произведенных исследований осмотического гемолиза человеческих эритроцитов автором описан метод, с помощью которого возможно кинетическое исследование K накопляющей функции эритроцитов. Метод основан на явлении т. н. »обратимого гемолиза« ; в течение гемолиза водой объемом приблизительно в 1,4 оболочка клеток становится проницаемой, например, в отношении к K, Na, фосфату, фруктозодифосфату. Восстанавливая изотонию добавлением Nacl проницаемость оболочек возвращается на нормальный уровень. Таким образом можно получить »клетки«, содержащие фруктозодифосфат, в содержимом которых количество Na превышает количество K. Суспендируя эти клетки в изотоническом растворе, содержащем приблизительно 40—50 мг% K, при температуре в 37°, в течение 2 часов в клетках накопляется значительное количество K, несмотря на то, что их исходная концентрация K было выше концентрации K в среде.

Physiologia

SOME FUNCTIONAL PROPERTIES OF HYPOTHALAMIC INHIBITION

By

E. GRASTYÁN, K. LISSÁK, T. HASZNOS and L. MOLNÁR

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY OF THE MEDICAL UNIVERSITY, PÉCS

(Received, December 26, 1952)

It was only in recent years that the problem of hypothalamic inhibitions has come into the foreground of interest (1, 2, 4, 5, 9, 11). This may be explained partly by the fact that the question of hypothalamic inhibition itself is of a rather problematic character, and partly because the cortical influence elicited from the inhibitory structures could not be so easily defined, and is less significant, than that of activatory, facilitatory processes. In a former series of experiments it had already been pointed out by the authors that somatomotor inhibition and vegetative processes were in close integrative correlation with each other. The verification of the problem on the hypothalamic level could, however, be made only statistically.

Independently from the authors, *Bach* (2), as well as *Thomson and Bach* (12), had made similar statements in 1948 and in 1950. Data concerning the hypothalamic adynamy and sleeping reactions published by *Hess* (6, 7) also supported the fact that beside the activatory system described by *Magoun and Moruzzi* (10), diencephalic inhibition must play a decisive role in the organisation of »extreme conditions« of the organism. The present paper deals in first place with the conditions of hypothalamic inhibition, with the qualitative parallelism of somatic and vegetative reactions, and with some peculiarities of the functional connection between the two hypothalamic systems.

Methods

The experiments were carried out on cats, with *Horsley—Clark's* technique. For anaesthesia, ether, chloralose and evipan were used. The simultaneous stimulation of the motor cortex and of the hypothalamus was carried out by means of two square wave stimulators, the voltage and the frequency of which could be changed independently. The foreleg flexion elicited from the motor cortex was registered kimographically by means of spiral transmission, blood pressure in the femoral artery by means of a mercury manometer, and respiration by means of a *Marey* capsule with the help of a tracheal cannula. Electroencephalographic recordings were made by means of a 6 channel *Kayser* electroencephalograph.

Results

Anaesthesia. Somatomotor inhibition elicited from the hypothalamus is considerably influenced by the quality and the depth of the anaesthesia.

Optimal conditions are ensured by superficial barbiturate narcosis (100 mg/kg). The site of action of barbiturates is in all probability elective, and in the first place they diminish the excitability of the facilitatory system. This assumption is supported by the fact that in the posterior part of the hypothalamic system,

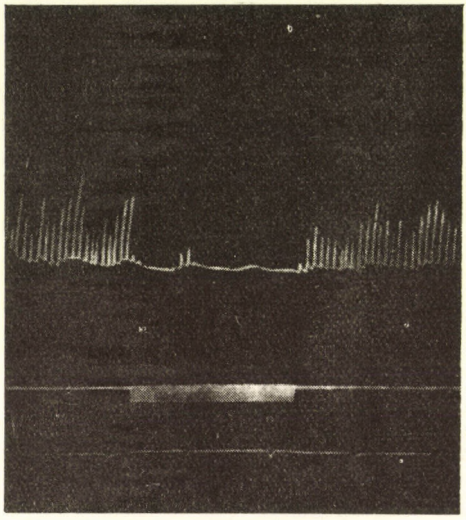


Fig. 1. Hypothalamic inhibition of foreleg flexion elicited from the motor cortex. Stimulus parameters, 10 c/sec ; 3,5 Volt ; 5 msec. Time marker, 10 sec. Localization N. ventromedialis hypothalami

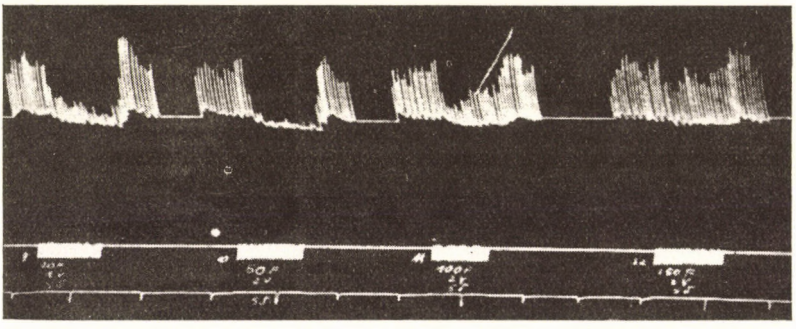


Fig. 2. The influence of various frequencies upon the size of inhibition to hypothalamic stimulation. Note that above 50 cps. the greater the frequency, the lesser the inhibition. Voltage 2 V, stimulus duration 5 msec. Time marker, 10 sec. Localization as in *Fig.* 1

where facilitation is dominant, at the appearance of rebound reactions — indicating a boundary of the two systems — with the deepening of the anaesthesia, it was possible to elicit a stable inhibition with stimulus parameters formerly causing facilitation. Chloralose is a narcotic so inadequate, that in case of a larger

dose no inhibition whatever can be demonstrated in the posterior area of the hypothalamus. Inhibition may be elicited also in full waking state following ether anaesthesia, but with a much lower voltage than the one commonly used (0,2 to 1,5 Volt). Current values above threshold voltages lead to reversal of the reaction at a certain point of the frequency scale, even in deep barbiturate anaesthesia.

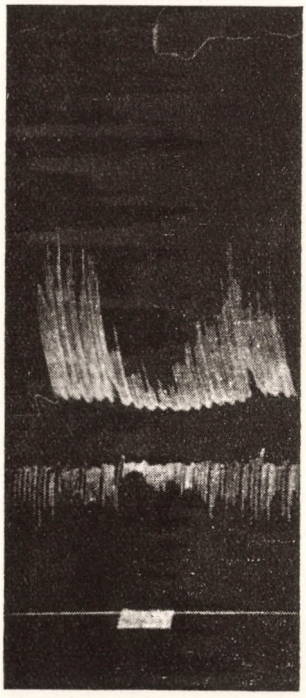


Fig. 3. Typical inhibitory synergism induced from the ventral part of the hypothalamus. Upper tracing, blood pressure ; second from top, foreleg movements elicited from the motor cortex ; third from top, respiration ; lowest tracing, stimulation. Stimulus parameters, 2 Volt ; 20 cps ; 5 msec. Localization, area preoptica

Localization of the inhibition. Inhibition dominates within the ventromedial, dorsomedial nuclear complexes of the hypothalamus, as well as in the supraoptic and paraventricular nuclei, and in the area preoptica. It can be followed over the area of the septum pellucidum and to the lateral part of the head of the nucleus caudatus. The inhibition can be traced also in the posterior part of the hypothalamus in a narrow stripe, immediately below the thalamus, as far as the mesencephalon. Facilitation could also be observed in the dominant inhibitory area most frequently at about 2 mm. from the midline, especially in the plane of the fornix. In other cases it could be observed in the close vicinity of the thalamus.

This fact led to the conclusion that the otherwise uniform inhibitory system was transversed by antagonistic, facilitatory bundles. The frequency characteristics of facilitation, and the types of reaction reversal observed, excluded the possibility of attributing inhibition and facilitation on the same neural elements. Investigations made at medium depths of barbiturate anaesthesia proved the existence of a uniform and coherent inhibitory system.

Stimulus parameters and inhibition. With the application of physiological voltages the frequency of the stimulation does not influence the direction of

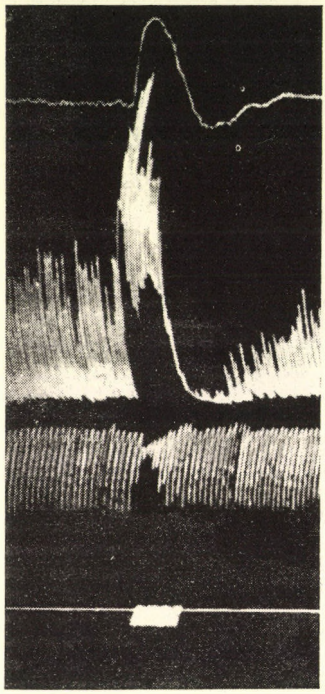


Fig. 4. Facilitation of cortically induced movements from the posterior part of the hypothalamus. Tracings as in Fig. 3. Stimulation followed by a rebound inhibition, during which the blood pressure falls

the reaction. In eliciting the inhibition, frequencies of 2 to 700/sec proved generally effective. In some cases the effect ceased above 300 impulses. Inhibition reached its maximum at low frequencies, at values of 6 to 50/sec, while upwards from these it gradually decreased (*Fig.* 1, 2).

The duration of the impulse means only a minimal effect. In some cases it could be observed that the *diminution* of the duration of the impulse increased the inhibition. In these cases, however, the stimulated point proved to be a borderland, and the paradoxical phenomenon could be ascribed to the interaction of

the facilitatory system which shows an extreme sensitivity to the duration of impulses. The fact that the nature of somatic inhibition depended on low frequency values was found to be a regular phenomenon also in other levels of the central nervous system. The reaction reversal due to changes in frequency could be in most cases attributed to inadequate voltages. Detailed information about the conditions of hypothalamic reaction reversal will be given in another paper.

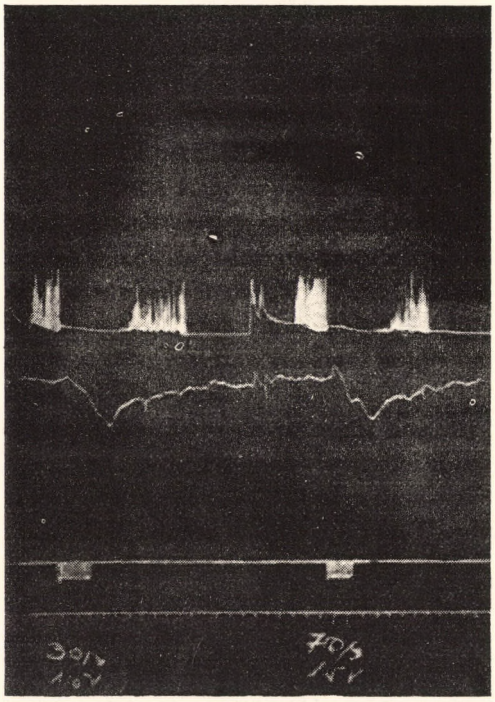


Fig. 5. Optimum frequency range for inhibition and for vasopressor response is low. With increasing the frequency the vasomotor effect becomes diphasic, it marks an adjacent antagonistic bundle. Voltage ; 1,5 V. Duration stimulus, 5 msec. Localization, area preoptica near to the fornix descendens

Inhibition and vegetative effects. Somatomotor effects elicited from the hypothalamus are accompanied in each case by vegetative reactions (*Fig.* 3, 4). Threshold values of the accompanying vegetative reactions were in part of the cases somewhat higher than those of somatic effects. The direction of the reactions was in most cases consequently the same, in case of inhibition of a parasympathetic character. If inhibition is associated with a vasomotor reaction of sympathetic character, the proximity of an antagonistic system can be assumed. The correctness of this assumption is proved by the observation that in such cases reaction reversal becomes manifest at further removal of the electrode, even in

case if the parameters of the stimulator are left unchanged. The proximity of an antagonistic system can be demonstrated also by the elective activatory effect of frequency. This phenomenon is shown in *Fig.* 5. In the case of the first stimulation a frequency of 30/sec elicited motor inhibition and a fall of the blood pressure. A frequency of 70/sec rendered the blood pressure effect already diphasic, inhibition remained, however, unaltered.

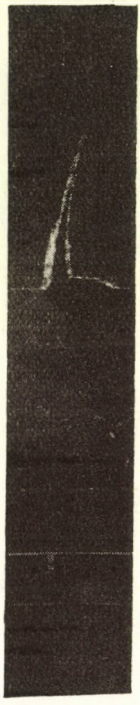


Fig. 6. Facilitation of cortically induced movements and a sharp rise of the blood pressure followed by rebound-inhibition and by a fall of the blood pressure after very brief stimulation. Upper curve, foreleg movements. Below blood pressure. Time marker, 5 sec. Localization, area preoptica

The sensitivity to frequency of vegetative reactions is always greater than that of somatic processes. This accounts for the fact that with stimulation above threshold intensities a synergism could be obtained in which somatic and vegetative reactions became inadequately associated. That the inhibition is accompanied by vegetative effects of a parasympathetic character even in physiological conditions, could be concluded from post-stimulatory rebound phenomena. It is always in borderland areas where rebound phenomena can be elicited.

Simultaneous registration of several effects shows that the rebound reaction is quite as complex as the effect itself gained by stimulation, which means that vegetative and somatic processes participate in it synchronously. Rebound

inhibition was in all cases regularly accompanied by a fall in blood pressure, contraction of the pupil, and inhibition of respiration. It may be assumed that visceral reactions not registered in the present series of experiments would behave in a similar way. *Fig.* 6 shows poststimulatory rebound inhibition and facilitation, elicited from the area preoptica. During rebound inhibition the blood pressure is decreased. *Fig.* 7 presents the same phenomenon related to respiration. Facilita-

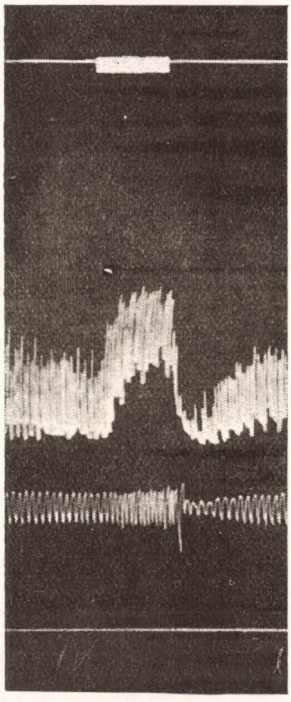


Fig. 7. Facilitation and postexcitatory inhibition from the posterior hypothalamus. Note that the motoric and respiratory rebounds change together in the same direction. Compare with *Fig.* 6. Time marker, 1 sec. Upper curve, stimulation

tion was elicited from the region of the posterior hypothalamic nucleus, and it was accompanied by an increase in the amplitude and frequency of respiration. During poststimulatory inhibition, both the amplitude and the frequency of respiration are markedly decreased. The physiological character of the rebound is proved also by the fact that at the optimal reversal points it could be elicited by means of near physiological threshold intensities, and that it often exceeded the size of the reaction elicited by stimulation. In purely inhibitory and facilitatory areas no rebound can be elicited with threshold intensities.

Periodical fluctuation. Poststimulatory reactions were not limited to a single reaction in each case. If it was possible to activate both systems with

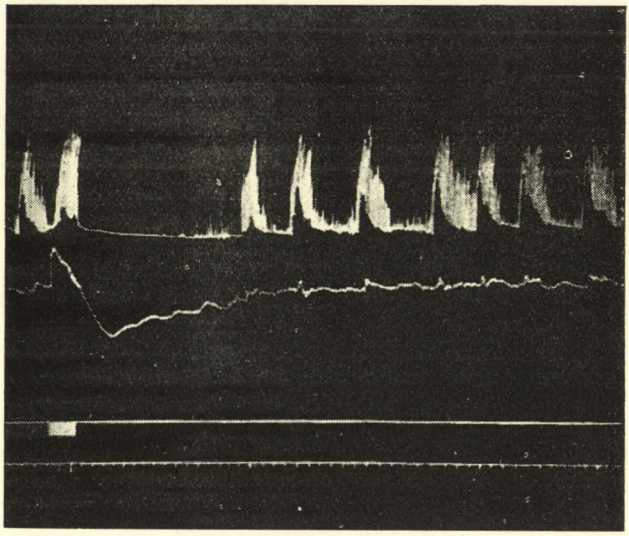


Fig. 8. Start of periodic fluctuation. Upper curve, foreleg flexion induced from the motor cortex Below, blood pressure. During excitation, great biphasic effect, immediately after the end of stimulation total rebound motor inhibition and simultaneous significant drop in blood pressure (cortex simultaneously stimulated). After some 50 secs., suddenly a more or less ordered periodicity begins. Stimulation, 70 cps ; 1,5 V ; 5 msec. Time marker, 5 sec. Localization : septum pellucidum partly in fornix descendens

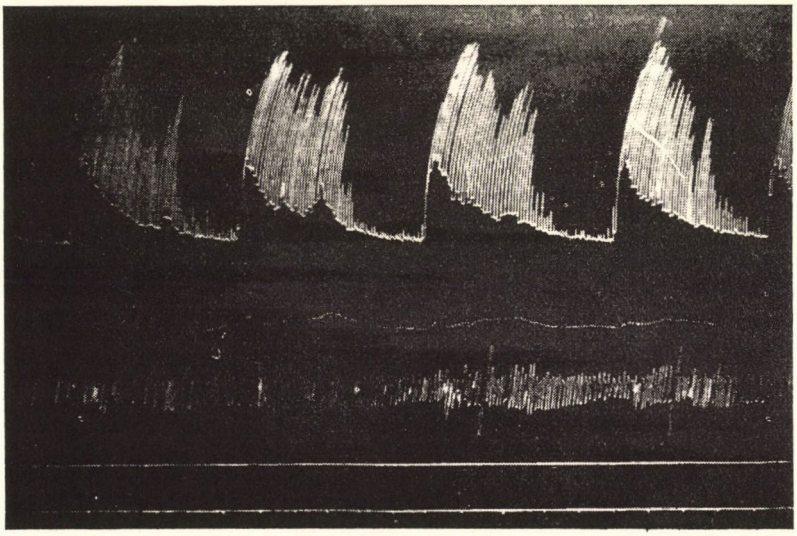


Fig. 9. **The definite shape of the periodic fluctuation. Upper curve, foreleg movements ; second from top, blood pressure ; next, respiration. All the three processes are changing in close parallelism and always in the same direction. Kimograph registration with a speed greater than before. Time marker, 5 sec.**

approximately the same intensity, as estimated from the size of the stimulatory and rebound reactions, the rebound produced another rebound, and in this way a periodic fluctuation was brought about, in the course of which inhibition and facilitation, as well as vegetative reactions of the same direction, were interchanging themselves at regular intervals. The starting of periodicity is shown in *Fig.* 8. During excitation the initial inhibition was replaced by facilitation. After excitation a powerful rebound inhibition was brought about, followed

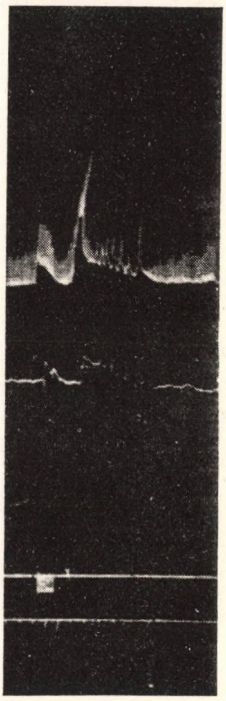


Fig. 10. Less remarkable and short-lived periodic fluctuation from another experiment. Localization of the stimulation point approximately the same as in the case presented in *Fig.* 9

after some time by a less regular periodical fluctuation. After a short while, the fluctuation became entirely regular (*Fig.* 9). The periodicity could then scarcely be altered, and kept on existing even without stimulation of the motor cortex. In such cases the facilitatory period is indicated by a general increase of the tone.

In the cases demonstrated in *Fig.* 8 and 9, one branch of the bipolar electrode was in the septal area, while the other on the fornix descendens. Before the electrode reached the fornix, diphasic reactions of lesser size indicated the appearance of the phenomenon, but no fluctuation could be started at these points. This extreme type of fluctuation of long duration could be elicited only by the stimulation of the hypothalamus, and in one case by that of the

gyrus cinguli. In the case mentioned above it was observed for 50 minutes. A short type of it could, however, be observed rather frequently (*Fig.* 10). The authors suggest the probability that barbiturate anaesthesia is helpful in eliciting the fluctuation. This is supported by the observation that fluctuation may appear also spontaneously with shorter duration, and in less marked forms. (*Fig.* 11.)

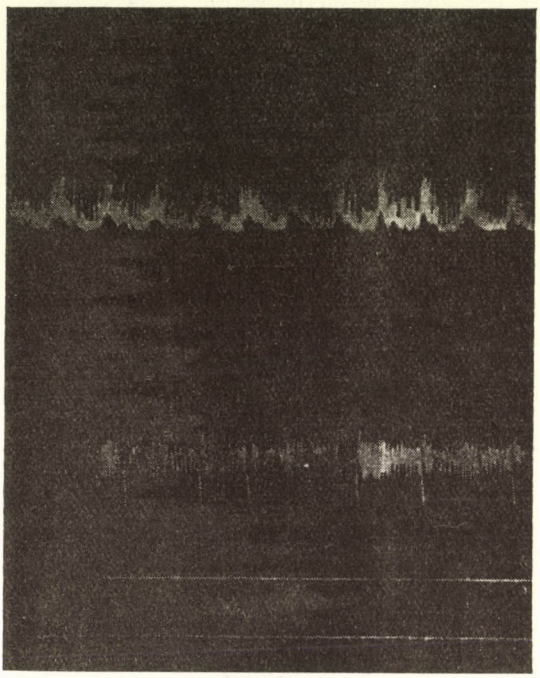


Fig. 11. Spontaneous periodicity developed in the decreasing phase of Evipan narcosis. Upper curve, movements elicited from the motor cortex. Below, respiration. Time marker, 5 sec.

EEG. observations. Electroencephalographic observations were carried out only on anaesthetized animals. Significant effects beside marked motor and vegetative alterations could only rarely be observed. In some cases, parallel to motor inhibition, a more or less marked depression was seen. In other cases a tendency to synchronization, appearing mostly as a rebound reaction, could be observed. Electroencephalographic registration or the fluctuation could, however, be carried out in no case.

Discussion

By means of electric stimulation, an independent and coherent somatomotor inhibitory system could be demonstrated in the ventral part of the hypothalamus.

Superficial barbiturate narcosis ensured optimal conditions, but independently of this, inhibition could be demonstrated also in the waking state. If the parameters of stimulation were optimal, and were adapted to the basic features of the system, it could clearly be stated that inhibition was regularly accompanied by parasympathetic vegetative reactions. The possibility of a chance coincidence was excluded by the fact that the poststimulatory rebound manifested itself in all cases as a pure synergism. At the same time, the observation supports the concept of *Hess* (8) on hypothalamic synergism. The consequent vegetative somatic parallelism postulates the assumption that vegetative factors too may be responsible for the active integration of inhibition and facilitation.

It had been stated in a previous paper (4) that by stimulating the central vagus trunk, EEG effects corresponding to the functional principle of diffuse projection systems could be elicited. Independently of us, *Zanchetti, Wang, and Moruzzi* (13) reached a principally similar conclusion in the course of EEG-investigations of vagus afferentation.

Recently, *French, von Amerongen, and Magoun* (3) reported that the diffuse brain stem activating system could be activated by the stimulation of the splanchnic nerve.

The demonstration of inhibiton in the supraoptic, paraventricular and tuberal regions seems, however, to support also the possibility that humoral afferentation may play a decisive role in the integration of the process discussed. Humoral afferentation may perhaps account for the otherwise hardly explainable fact that diffuse projection systems are capable of maintaining their functional tone even after complete neural deafferentation.

The close functional connection existing between the inhibitory and facilitatory systems offers a definite proof that the two constitute an anatomically differentiated but functionally inseparable balance or feed back system. In the course of the present investigations the conclusion was reached that the periodic fluctuation elicited from the diencephalon was essentially an accelerated and exaggerated model of the two limiting conditions of behaviour, of sleep and waking.

Summary

By means of adequate stimulatory conditions, an independent somatomotor inhibitory system could be demonstrated at the ventral part of the hypothalamus. The system dominates in the region of the tuberal nuclei and in the area preoptica, but it can be traced also in the septal nuclei, in the lateral part of the caput nuclei caudati. The parallelism of parasympathetic vegetative reactions accompanying inhibition is a regular phenomenon. The close functional interdependence of the facilitatory and inhibitory systems manifests itself in poststimulatory rebound reactions and in a periodical fluctuation of prolonged duration developing from them.

LITERATURE

1. *Austin, G., Jasper, H.:* Federation Proc. **9**, 6 (1950).
2. *Bach, L. M. N.:* Federation Proc. **7**, 7 (1948).
3. *French, J. D.,* von *Amerongen, F. K., Magoun, H. W.:* Arch. Neurol. Psychiat. **68** 577 (1952).
4. *Grastyan, E., Hasznos, T., Lissák, K., Molnár, L., Ruzsonyi, Z.:* Acta Physiol. Hung. **3** 103 (1952).
5. *Gualtierotti, T., Martini, E., Marzorati, A.:* J. Neurophysiol. **13**, 455 (1950).
6. *Hess, W. R.:* Helv. Physiol. Acta **2**, 137 (1944).
7. *Hess, W. R.:* Helv. Physiol. Acta **2**, 305 (1944).
8. *Hess, W. R.:* »Die Functionelle Organisation des Vegetativen Nervensystem« Benno Schwabe 1948.
9. *Hodes, R., Peacock, Jr. S. M., Heath, R. G.:* J. Comp. Neurol. **94/3**, 381 (1951).
10. *Moruzzi, A.* and *Magoun, H. W.:* EEG. Clin. Neurophysiol. **1**, 455 (1949).
11. *Martini, E., Gualtierotti, T., Marsorati, A.:* J. Neurophysiol. **13**, 117 (1950).
12. *Thompson, W. C.* and *Bach, L. M. N.:* J. Neurophysiol. **13**, 455 (1950).
13. *Zanchetti, A., Wang. S. C., Moruzzi, G.:* EEG. Clin. Neurophysiol. **4**, 357 (1952)

ОСОБЕННОСТИ ГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ТОРМОЖЕНИЯ

Е. Граштян, К. Лишшак, Т. Хаснош, Л. Мольнар]

Физиологический институт медицинского университета, г. Печ

Р е з ю м е

В вентральной части гипоталамуса можно выявить электрическим раздражением отдельную соматомоторную систему торможения. Эта система преобладает в области туберальных ядер, и area praeoptica но за ней можно следить и в области септальных ядер, в латеральной части хвостатого тела и в передних ядрах зрительного бугра. Для локализации торможения обеспечивается оптимальная возможность поверхностной наркозой барбитуратом. Торможение выявляется однако и в бодрствующем состоянии. Система торможения не имеет соматотопического характера. Торможение легче всего выявляется при характеристических показателях электрического раздражения (частота, длительность импульса, напряжение). Соматомоторное торможение сопровождается вегетативными реакциями парасимпатических нервов, последовательно одинакового направления. Направление вегетативных эффектов, сопровождающих моторные последействия раздражения (rebound) убедительно с той точки зрения, что эта параллельность не является артефактом раздражения. Из явлений rebound-а, последовавших раздражению, при таких случаях, когда в двух антагонистических системах гипоталамуса удалось вызвать одновременное возбуждение приблизительно одинаковой интенсивности, развивается длительная, самопроизвольная периодическая флюктуация. В этой флюктуации процессы возбуждения и торможения чередуются в равномерных периодах. Тесная функциональная связь между фацилитационным и тормозящим системами гипоталамуса доказывает, что эти две системы представляют собой анатомически дифференцированную, но функционально неразделимую систему равновесия.

ANALYSIS OF HYPOTHALAMIC REACTION REVERSAL

By

E. GRASTYÁN, K. LISSÁK, T. HASZNOS

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY OF THE MEDICAL UNIVERSITY, PÉCS

(Received, December 26, 1952)

It has been shown by several authors that the direction of effects elicited by electric stimulation of the hypothalamus is decisively influenced by frequency (1, 2, 3, 4). This means that the same area can produce both sympathetic and parasympathetic effects as well as somatomotor facilitation and inhibition, if stimulated with a current of constant intensity and wave-form, but of changing frequency. These facts have made it probable that, on the one hand, no strict local separation of the antagonistic functions within the hypothalamus might be assumed and, on the other, that reaction reversal might be the inherent feature of one and the same neural elements.

In the course of experiments made in other lines by the present authors, it was observed that reaction reversals could be induced from the hypothalamus not only by means of frequency changes, but also by elective changes of impulse duration, of voltage, and of the depth of anaesthesia. The different types of reaction reversal were also determined by the site of the stimulated point. The most decisive factor proved to be in all cases the voltage of the stimulation. The conclusion to be drawn from this fact was contradictory to the data which have been published on reaction reversal. This is why detailed investigation of the problem seemed interesting. In the course of their experiments, the authors arrived to the conclusion that hypothalamic reaction reversal was a regular phenomenon, that from the viewpoint of localisation it could be regarded a stimulatory artefact (as a consequence of the current dispersion).

Methods

The experiments were made in cats, using the *Horsley—Clark* technique. Stimulation of the hypothalamus was carried out by means of platinum electrodes. Ether and evipan were used for anaesthesia. Control observations were made in the waking state following ether narcosis. For stimulation, a square wave stimulator was applied, with which the duration of impulse, the frequency, and the voltage could be changed independently. Blood pressure in the femoral artery was registered by means of a mercury manometer. The registration of respiration was made with a *Marey* capsule through a tracheal cannula.

The movements of the foreleg elicited from the motor cortex were registered by means of a spiral transmission on a kimograph, simultaneously with vegetative reactions. The sites of the stimulation points were histologically confirmed in haematoxilin-eosin stained sections after sacrificing the animals.

Results

All effects elicited from the hypothalamus were reversible. The reversal depended, however, essentially on the voltage applied. Following the application of threshold intensity, a reaction reversal could be elicited so rarely, that it cannot be regarded as a regular function of the hypothalamus. This phenomenon

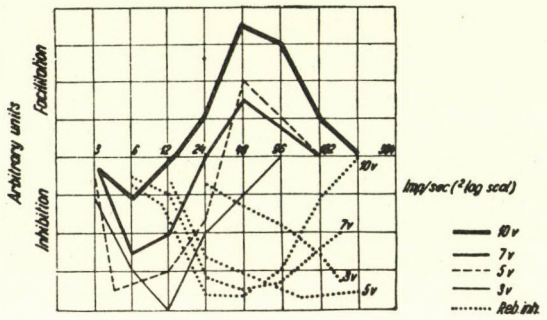


Fig. 1. Relation between stimulus frequency, voltage, and reaction reversal, in the case of stimulation of the N. paraventricularis. The data given refer to somatomotor inhibition and facilitation. A reciprocal relation exists between voltage and frequency, i. e. the higher the voltage, the nearer the reversal point to the zero point on the frequency scale, and the lesser the inhibition. Dotted lines represent post-excitatory rebound processes. The sizes of inhibition and facilitation are given upon the ordinata in arbitrary units. For further explanations see the text

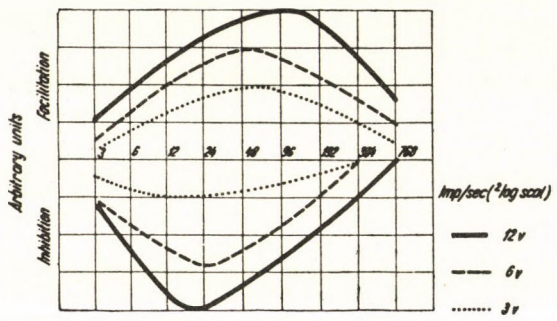


Fig. 2. Pure inhibitory and facilitatory curves derived from stimulations of the anterior and posterior regions of the hypothalamus. In this case no reaction reversal could be demonstrated, even with higher voltages

was produced rather by the extremely rare possibility of placing the electrode at exactly the same distance from the two antagonistic systems. The points at which reaction reversal could be demonstrated in this way were termed »optimum of reaction reversal«. Such areas are those before the anterior and posterior commissures, as well as the areas of the hypothalamus adjacent to the thalamus. If the stimulation did not exceed the threshold value, a change in frequency

influenced in most cases only the size of the effect, but not its direction. With the gradual increase of the voltage — in the waking state some tenths of a Volt were sufficient — reaction reversal occurred at a certain point of the frequency scale. Regularities in the connections between stimulation intensity and reaction reversal are shown in *Fig.* 1. The observed effect consisted in this case in hypothalamic inhibition and facilitation of the foreleg flexion (paraventricular nucleus).

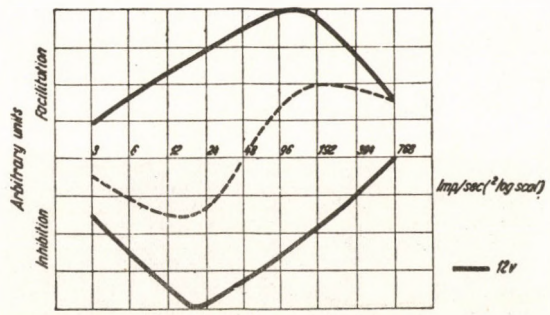


Fig. 3. Resultant curve (broken line) derived from the experiment presented in Fig. 2. This resultant curve represents the typical functional properties of the optimal reversal points.

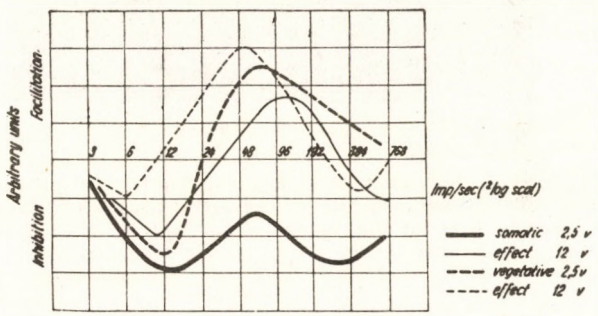


Fig. 4. The nature of parallelism between somatic and vasomotor processes induced from the region of the ventromedial hypothalamic nucleus. It shows that vasomotor processes are much more sensitive to frequency changes than somatomotor process, but the main characteristics of both are always consistent

At 3 Volt, equal to the threshold, no frequency caused reaction reversal. With the gradual increase of the voltage, inhibition turned into facilitation at gradually lower frequencies, i. e. the inhibitory area within the curve became always smaller, while facilitation always increased. The behaviour of the rebound reaction which followed stimulation was interesting in this case (dotted lines). At first it seems to be paradoxical that inhibition should be followed by inhibitory rebound, but a closer analysis of the diagrames explains the contradiction. Rebound occurred in most cases when the inhibition had reached its maximum and begun to decrease. It had reached its maximum when, after

reaction reversal, facilitation had also reached its maximum. This phenomenon can be explained only by the fact that before the reversal of reaction, facilitation has already been associated with inhibition but, owing to the preponderance of inhibition, it did not manifest itself. (See *Figs.* 5 and 6.) Rebound inhibition is thus the rebound of latent facilitation. Rebound inhibition may be frequently observed in the ventral area of the hypothalamus, while rebound facilitation occurs in posterior areas. It must be taken partly for a physiological phenomenon, as it becomes manifest in some cases also on stimulation with threshold intensities. Its physiological feature is further ascertained by the observation that in some cases it indicates the start of a periodical fluctuation of long duration.

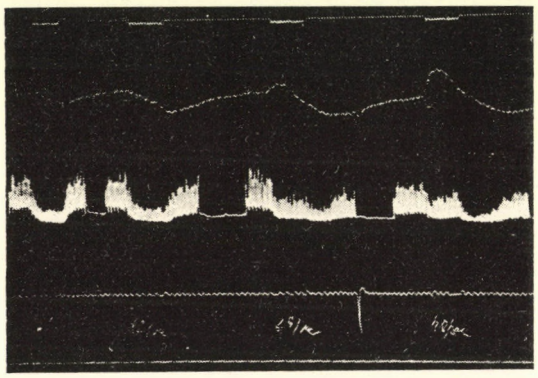


Fig. 5. Influence of different frequencies upon hypothalamically induced vasomotor, respiratory and somatomotor processes. Note that with increasing the frequency, the vasodepressor effect converts before the somatomotor one, but parallel with this, postexcitatory rebound reactions appear on both. First line, stimulation ; upper curve, blood pressure ; second from top, foreleg movements elicited from the motor cortex. Third from top, respiration. Time marker, 1 sec.

It is likely that this verifies the natural interaction of the two hypothalamic systems as a feed-back system.

It was convincingly proved by these facts that reaction reversal was a consequence of current dispersion. The effect of frequency can, however, be interpreted only by assuming a decisive difference in the frequency affinity of the two systems participating in the effectuation of the phenomenon. Several areas could be demonstrated in which no reaction reversal could be induced with the application of physiological voltages. *Fig.* 2 shows facilitatory curves gained from the posterior area, and inhibitory curves from the ventral part of the hypothalamus. The optimal frequency of inhibition was in each case 24/sec. while facilitation occurred between 96 and 192/secs. The resultant curve derived from the facilitatory and inhibitory curves represents the typical reversal curve. (*Fig.* 3.)

With intensity and frequency constant, changing the duration of the impulse exerted a small effect on inhibition in the practically pure inhibitory zones, whereas it had a great influence upon facilitation. A shortening of the duration from 10 to 0.2 msec. was capable of producing such a decrease of facilitation, as a lowering of frequency from 100/sec to 50/sec. This accounts for the frequently observed fact that inhibition *at the optimum reversal points* is considerably increased by a shortening of the duration of the impulse and at the same time it also explains the appearance of reaction reversal obtained by changing the duration of the impulse.

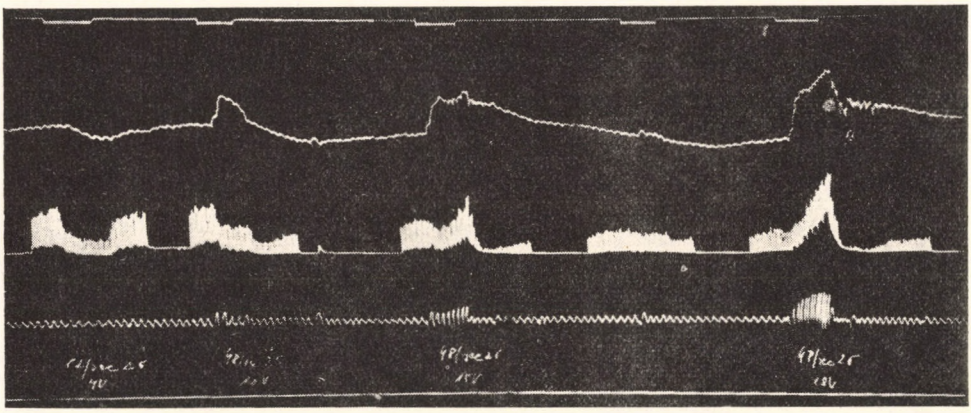


Fig. 6. Influence of various voltages upon hypothalamically induced vasomotor, respiratory and somatomotor processes. Same case as in *Fig.* 5. Parallel with the gradual increase of the voltage, the whole picture converts again into a pure synergism. The order of the curves is the same as in *Fig.* 5.

The depth of anaesthesia has also a considerable effect on reaction reversal. At labile points inhibition instead of facilitation may be elicited by stimulation, even with constant values if the anaesthesia was deepened. Inhibition may be produced also in unanaesthetized animals, but in that case even a minimal increase in stimulus intensity suffices to elicit a reversal of the reaction and the frequency range of inhibition becomes extraordinarily narrow. By an extreme increase in the intensity of stimulation, reaction reversal can be elicited over the whole area of the hypothalamus even in deep anaesthesia.

Somatic reactions elicited from the hypothalamus were in all cases accompanied by vegetative reactions of the same direction. Inhibition was accompanied by parasympathetic, while facilitation by sympathetic effects. This parallelism, qualitatively identic even in direction, became manifest also in reaction reversal.

With increase of the voltage, however, vegetative reactions mostly preceded the reversal of somatic reactions. Thus a mixed functional picture is produc-

ed, which may lead to the conclusion that the parallelism between the two spheres is not uniformly regular. This case is demonstrated in Fig. 4. Broken lines indicate vasomotor, full lines somatic processes. With a further increase in intensity, the somatic effect became also reversed, and so the complete synergism was restored even in the qualitative sense. Figs. 5 and 6 show the effects of one and the same hypothalamic point at different voltages but for the reversal of inhibition a considerably higher voltage is needed than for the reversal of blood pressure, or respiratory reactions.

Conclusions

The decisive role which stimulus intensity plays in reaction reversal proves that reaction reversal in the case of direct hypothalamic stimulation is from the point of view of localisation an artefact due to current dispersion. In view of the extremely complex organisation of the hypothalamus, this conclusion seems to be evident. The importance of the frequency factor can be ascribed to the sharply different frequency affinity of the two systems. If the intensity of the voltage does not lead to a considerable current dispersion a change in frequency influences in all cases only the size of the reaction but not its direction.

The facts observed allow the direct conclusion that within the hypothalamus there are virtually two systems existing, forming a functional unit, the strict localization of which can, however, be carried out only by means of extremely delicate methods of stimulation.

Reaction reversal, in spite of its artefact character, allows the disclosure of interesting connections, especially as to the physiological interaction of the two hypothalamic systems.

LITERATURE

1. *Grastyán, E., Káldor, V., Lissák, K., Molnár, L.* and *Ruzsonyi, Z.:* Acta Physiol Hung. **2**, 1 (1951).
2. *Hare, K., Geohegan, A. W.:* J. Neurophysiol. **4**, 266 (1941).
3. *Uvnäs, B:* Proc. Soc. Biol. & Med. **64**, 181 (1947).
4. *Hinsey, J. C.:* Res. Publ. Ass. nerv. ment. Dis. **20**, 657 (1940).

УСЛОВИЯ ОБРАТИМОСТИ РЕАКЦИИ ГИПОТАЛАМУСА

Е. Граштян, К. Лишшак, Т. Хаснош

Физиологический институт медицинского университета, Печ

Р е з ю м е

Рядом авторов описано, что частота примененного раздражителя решающим образом повлияет на направление эффектов, вызываемых из гипоталамуса. Этот факт приводил к заключению, согласно которому противоположенно направленные функции гипоталамуса отдельной локализации не имеют. На основе сказанного выдвигалась возможность о передаче двух функций различного направления посредством одних и тех же нервных элементов.

Авторами было установлено четыре условия обратимости реакции. А именно: . Напряжение тока раздражения, 2. частота раздражения, 3. длительность импульса, . обратимость реакции путем изменения глубины наркоза при постоянных условиях, аздражения. За исключением тех точек (т. н. оптимальных точек поворота реакции), ри которых две антагонистических системы очень близкие друг к другу, применением орогового напряжения обратная реакция не вызывается. Помимо этого случая, в дру- их областях гипоталамуса постепенным, иногда крайним повышением напряжения 10—20 вольт) обратимость реакции всегда проявляется. Анализ различных типов обра- имости реакции и первичная роль напряжения в направлении реакции приводил к ому выводу, что поворот реакции, вызванный прямым раздражением гипоталамуса вляется артефактом раздражения. Однако, несмотря на артефициальный характер того явления, его можно использовать при анализе элементарных механизмов связи азличных систем.

THE FUNCTIONAL RELATION BETWEEN GYRUS CINGULI AND CAUDATE NUCLEUS IN THE CAT

By

E. GRASTYÁN, K. LISSÁK and L. MOLNÁR

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY OF THE MEDICAL UNIVERSITY, PÉCS

(Received, January 22, 1953)

The investigations of *Danilewsky* (3) had first called attention to the somatomotor inhibitory function of the caudatum. This finding had for the most part been forgotten until it became verified by the systematic investigations of *Mettler*, *Ades*, *Lippman* and *Culler* in 1939 (11). The investigations of *Dusser* de *Barenne*, *Garol*, and *McCulloch* (4), as well as those of *Dusser de Barenne* and *McCulloch* (5) cleared the fact that the suppressor areas possessed a localized projection in the caudatum. But still the fact remained unexplained, that the integrity of the caudatum was needed only for the suppression of cortical electrical activity, while the inducement of motor suppression was not influenced even by relatively extensive lesions of the caudatum (5).

In the course of investigations concerning the motor inhibitory function of the caudatum and of the integration types of the parallel vegetative effects, the present authors made the observation that the caudatum could not be regarded as functionally homogeneous. Beside inhibition, facilitation of a definite and localized character could also be demonstrated. This observation suggested the idea that the key of the functional mechanism of inhibitory and facilitatory effects induced from the gyrus cinguli was to be sought within the caudate nucleus. In fact, it was possible to bring about, by way of isolated lesions corresponding to experience gained in the course of the functional localization (inhibition, facilitation) of the caudatum, effects which, in contradiction to the above mentioned conception (5), postulated the integrity of the caudatum, concerning also the prompt motor inhibitory and facilitatory effects.

It must be noted that it was chiefly concerning the area 4^s that *Dusser de Barenne* and *McCulloch* (5) had arrived to the aforementioned conception and so it remained to a certain degree problematic whether in relation to the nucleus caudatus the functions of the two suppressor areas might be identified. The problem concerning the area 4^s, had not been investigated by us.

The present paper deals, beside the problem mentioned, with the qualitative parallelism of somatic and vegetative effects elicited by stimulation of the caudatum and the gyrus cinguli.

Methods

All investigations were made in acute experiments in cats, in evipan and chloralose anaesthesia. Stimulation of the caudatum and its electrolytic coagulation was carried out with bipolar platinum electrodes, according to the Horsley-Clark technique. The intensity and frequency, as well as the duration of the impulse could be independently altered on the square wave stimulator. The exposure of the gyrus cinguli was performed after a broad bifrontal craniotomy or by slightly pulling aside or removing the opposite frontal lobe. Cortical movements from the motor cortex (foreleg flexion) as well as respiration and blood pressure were registered kymographycally. The registration of respiration was carried out through an inserted tracheal cannula with a Marey capsule, that of blood pressure by means of a mercury manometer, through a cannula introduced into the femoral artery. The site of the stimulation points and of the coagulation were histologically confirmed in haematoxilin-eosin stained sections after sacrifice.

Results

Caudate nucleus. A total of 669 stimulations were performed at 282 points of the head of the caudatum, on 31 animals. Table 1 shows the distribution of effects. Out of the 282 points localized 52 per cent. fell into the medial part

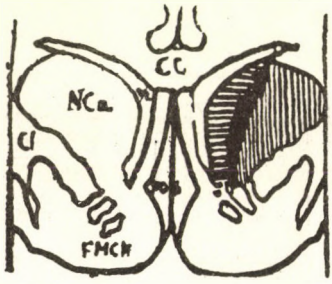


Fig. 1. Sketch of the middle part of the caput nuclei caudati of cat, showing the distribution of inhibitory and facilitatory fields, as summarized from 31 experiments

of the head of the caudatum, and 48 per cent. into the lateral part. Inhibition could dominantly be localized into the lateral part, and it occupied a larger area than the medially localizable facilitation (*Fig.* 1). Table 1 shows the relation between the two areas. Though localization proved in most cases stable, it is worth mentioning that in 6 out of 31 animals, only facilitation or only inhibition could be elicited. There was no explanation for this observation. Each point

TABLE 1a

Type of effect	No.	Per cent.
Inhibition	270	40,4
Facilitation	255	38,1
Biphasic	9	1,4
Insignificant	135	20,1
Total No.	669	

Distribution of inhibitory-facilitatory effects of 669 stimulations of the caudate nucleus

TABLE 1b

	Medial 149 point		Lateral 133 point	
	No.	Per cent.	No.	Per cent.
Inhibition	28	18,5	104	78,2
Facilitation	85	57,0	13	9,8
Insignific.	36	24,5	16	12,0

Distribution of inhibition and facilitation in the medial and lateral parts of the caudate nucleus, summarized from 282 stimulated points

was stimulated with several different frequencies. The frequency-sensitivity of inhibition and facilitation was approximatively the same as that in the hypo-

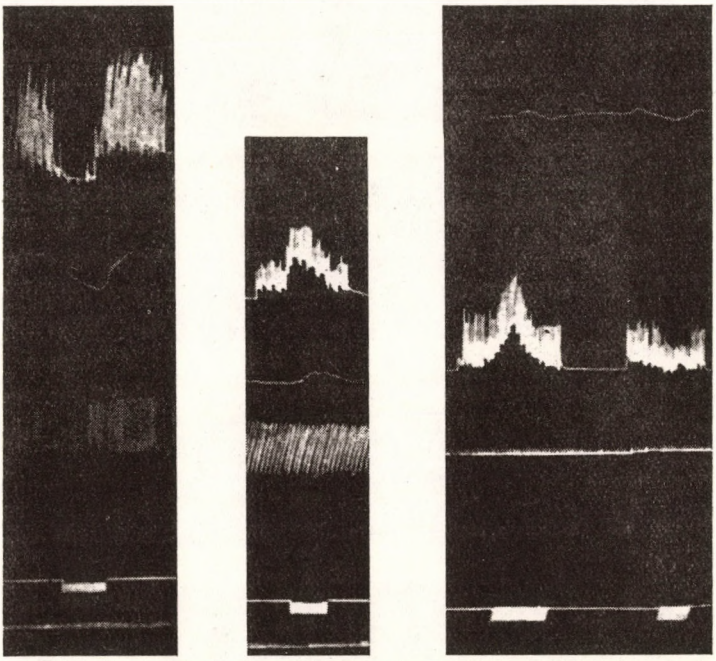


Fig. 2. Prompt inhibition of movements induced from the motor cortex, evoked from the lateral part of the caudate nucleus. Parallel fall of blood pressure and slight respiratory inhibition. Upper line, foreleg movements; second blood pressure; third, respiration

Fig. 3. Facilitation with a slight tonic component, induced from the medial part of the caput nuclei caudati. Upper line, movements induced from the motor cortex; second from top, blood pressure; third from top, respiration. Time marker, 1 sec

Fig. 4. Frequency-conditioned reaction reversal by stimulation of a given point in the middle portion of the caput nuclei caudati. Upper line, blood pressure; below, movements elicited from the motor cortex

thalamus (6). The frequency optimum of inhibition was as low as 10 — 50 cps.) while that of facilitation was as high as 50—150 cps. (*Figs.* 2 and 3). With

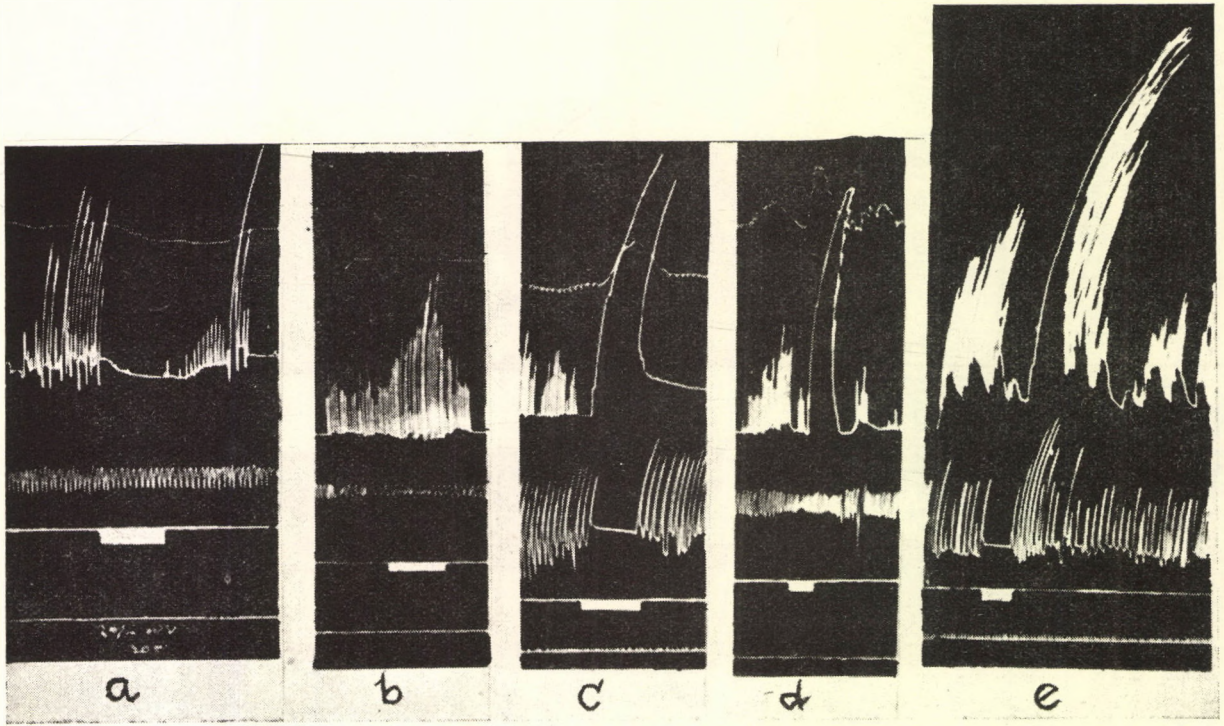
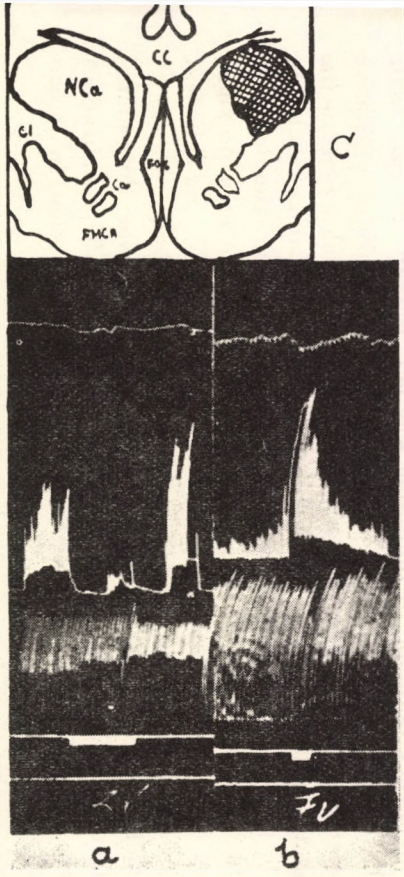
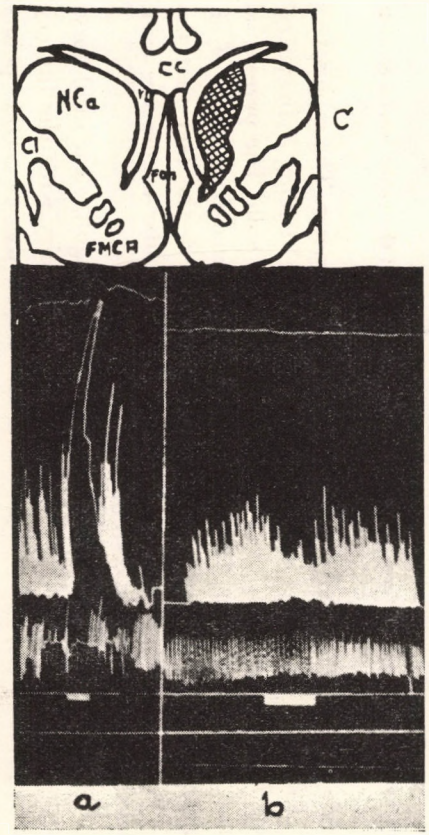


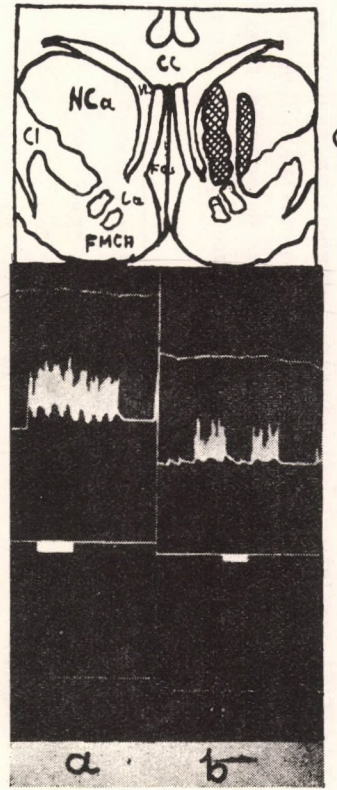
Fig. 5. Various types of records gained by stimulation of the anterior limbic cortex. *a)* Prompt inhibition and blood pressure drop. Upper line, blood pressure ; second from top, movements elicited from the motor cortex ; third from top, respiration. *b)* Facilitation of cortically induced movements. First line, blood pressure ; second, movements ; third, respiration. *c)* Inhibition changing to increased tone during stimulation. This is the most common type observed following stimulation of the limbic cortex. First line, blood pressure ; second, movements ; third, respiration. *d)* The same as in Fig. *c*, but the frequency of respiration increased. *e)* Inhibition and poststimulatory facilitation. Note that during the rebound facilitation the rate of respiration is increased



6



7



8

Fig. 6. Influence of selective lateral coagulation of the caudate nucleus on effects elicited from the anterior limbic cortex. *A)* before coagulation, *B)* after coagulation. Stimulus parameters the same in both. *C)* site of coagulation (shaded area). *Fig. 7.* Influence of a medially placed coagulation on effects elicited from the anterior limbic cortex. *A)* before coagulation; *B)* after coagulation; *C)* site of coagulation. *Fig. 8.* Influence of a medially placed caudatum coagulation in a case when the frequency of the stimulus applied on the anterior limbic cortex was ineffective before coagulation. *A)* before stimulation; *B)* after stimulation; *C)* site of coagulation

extreme frequency values reaction reversal could be elicited at the border of the two zones (*Fig.* 4). Vegetative effects appearing parallel with facilitation and inhibition were in most cases less marked than in the hypothalamus. The percentual qualitative distribution of blood pressure changes determined from 262 points can be seen in Table 2. Inhibition was generally accompanied by parasym-

TABLE 2

Type of effect	No.	Per cent.
Blood press. fall	157	25,8
Blood press. rise	122	20,0
Biphasic	14	2,3
Insignificant	316	51,9
Total No.	609	

Distribution of vasomotor effects determined with 609 stimulations in the caput nuclei caudati

pathetic, while facilitation by effects of sympathetic character. The qualitative parallelism of somatic and vegetative reactions was not so striking as in synergism obtained by stimulation of the hypothalamus and the bulb. The percentual distribution of vegetative effects and of synergisms obtained from areas of an optimally clear function pointed, however, convincingly to the fact that the parallelism existing between the two functions was a regular occurrence even upon this level of the nervous system.

The gyrus cinguli. With stimulation of the gyrus cinguli, clear inhibitory, facilitatory, or mixed effects could be elicited, in conformity with the literary data published [*Kaada* (8)]. The direction of the effects was at certain points decisively influenced by the parameter of the stimulation, in the first place by the voltage and frequency. Similarly as in other levels of the central nervous system, the frequency optimum of inhibition was low, i. e. 10—50 cps., while that of facilitation was high, i. e. 50—200 cps. The appearance of vegetative effects registered synchronously with somatic processes led also here to the conclusion that parallelism of the same direction was a dominant rule. In Figure 5 a, b, c, d, e, effects of different types, elicited by the stimulation of the gyrus cinguli, are shown. Inhibition was dominant in the area proximal to the knee of the corpus callosum, but apart from that there was no sufficient ground for a strict topical separation of inhibition and facilitation.

The marked tonic component shown in *Fig.* 5 c, d, e, was interpreted as the interaction of inhibition and facilitation. *Fig.* 5 e offers indications concerning the physiological nature of the parallelism of facilitation, inhibition and respiratory changes.

It is noteworthy that the periodical fluctuation observed following the stimulation of the hypothalamus could be elicited in one case also with stimu-

lation of the gyrus cinguli. The functional mechanism and the detailed analysis of this process are discussed in another paper (6).

The functional connection between the gyrus cinguli and the caudate nucleus

Electrolytic coagulation were performed in the caudatum of 22 animals. It was most striking that the functional alteration of the gyrus cinguli was in each case dependent on the elective localization of the lesion in the caudatum. Most coagulations were made according to experience gained during localizatory investigations of the caudate nucleus. In conformity with this, after coagulation of the lateral part, the inhibition elicited from the gyrus cinguli became considerably diminished or disappeared entirely, having been substituted by facilitation. On the other hand, coagulation of the medial part was associated with the decrease or disappearance of facilitatory processes and with a definite increase of the inhibition. If the lesion did not correspond to the special localization of inhibition and facilitation, either no change could be observed in the effects induced from the gyrus cinguli, or both functions showed an equal decrease. In case of specially directed lesions, the function of the gyrus cinguli was never found unaltered. *Figures* 6, 7 and 8 demonstrate 3 typical cases. In each figure the first picture demonstrates the effect of the gyrus cinguli before, while the second the state after, coagulation.

Fig. 6 shows before coagulation a marked inhibition exceeding the duration of stimulation. The effect was elicited by stimulating the anterior part of the gyrus cinguli. The lateral part of the head of the caudatum was almost completely destroyed by the lesion. As a result, stimulation after coagulation induced a marked facilitation instead of inhibition. *Fig.* 7 shows the opposite of the former intervention. The lesion destroyed the medial area of the caudate nucleus almost as far as the base of the nucleus. The facilitatory effect and the increase of the tone present before the coagulation reversed after the operation, and a definite inhibition manifested itself. *Fig.* 8 shows a case in which stimulation of the gyrus cinguli with a certain frequency had been ineffective before coagulation. After a medial lesion has been placed, the formerly indifferent frequency elicited complete inhibition during stimulation. According to observations hitherto made, the lesion of the caudatum, irrespective of its localization, exerts less influence upon vegetative effects, than motor ones. To a certain extent, respiratory changes represent an exception as the integrity of the caudatum seems to be absolutely indispensable for their appearance.

Discussion

On the ground of the present experiments it seems that prompt motor inhibition and facilitation elicited from the gyrus cinguli postulates the integrity of the caudate nucleus. Although it is made probable, but no absolute

conclusion is permitted by that fact as to a functional connection between the caudatum and the other suppressor areas. Assuming, however, that data valid for the gyrus cingularis may be applied upon the functions of area 4^s, it seems probable that the lesions carried out in the experiments of *Dusser de Barenne and McCulloch* (5) were either too small or inadequately placed. In the course of the present series of experiments the conclusion was reached that elective changes in the function of the gyrus cingularis could be obtained only by coagulations covering some functionally coherent area of the caudatum. Facilitatory effects elicited by the stimulation of the gyrus cinguli supported the recent literary data [*Kaada* (8)] while, as to facilitation localized in the medial part of the caudatum, similar data have been published by *Hodes, Peacock and Heath* (7). In their investigations made under physiological conditions, *Akert and Anderson* (1) found no facilitation. For the time being, no explanation can be offered for the fact that in a small part of the cases only a single type of effect could be elicited from the caudatum. The selective effect of localized coagulation on the function of the gyrus cinguli supported the double and isolated representation found within the caudatum. As to the mechanism of the influence of the caudatum, considering the incomplete anatomical data available we are compelled to conjecturing. Considering the findings of *McCulloch, Graf and Magoun* (10), confirmed also for area 24 by *Ward* (12), according to which the cortical suppressor areas are in direct connection with the suppressor area of the bulbar formatio reticularis, the massive decrease of limbic suppression produced by the lesion of the caudatum cannot be understood. However, by the fact that an elective lesion of the caudatum caused in most cases not simply a decrease or cessation of the suppression, but also a change in the direction of the effect, i. e. it resulted in facilitation, the possibility is offered that the decisive effect upon the gyrus cinguli is ensured not by the efferent, but by the afferent connections of the caudatum.

Since the investigations of *Clark* and associates (2) it has been known that the suppression elicited from the gyrus cinguli is largely dependent on anaesthesia. According to their observations, in the waking state facilitation is sooner induced than suppression. In investigations concerning the hypothalamus we have frequently met with the suppression increasing effect of barbiturates which had been obvious also from other previous observations [*Laidlaw* and *Kennard*, (9)]. As regards their effect, narcosis and coagulation are up to a certain point comparable. Starting from this fact it may be assumed, that by the specially limited caudatum coagulation an afferent tonic effect is being effaced in a selective way. If this assumption is correct it allows the conclusion that the level of sensitivity of certain cortical elements is decisively determined by an afferentation of subcortical tonic character even in the case of direct artificial stimulation. That this assumed tonic effect may be based on vegetative processes, or that at least these latter participate in it in a decisive

manner, is corroborated by the strict vegetative somatic parallelism whichwas found to be a regular occurrence in both areas. To the best of our knowledge, this hypothesis has, however, not been confirmed by exact anatomical observations. According to present knowledge, the area 24 does not receive afferents from anywhere except from the anteromedial thalamic nuclei [(*Ward* (12)]. Neuronographic investigation into the details of the problem is in course.

Summary

A narrower medial facilitatory and a broader lateral inhibitory zone could be demonstrated by electric stimulation of the head of the caudatum. Isolated lesion of these two zones resulted in decrease, extinction or reversal of the prompt motor inhibitory or facilitatory effects induced by stimulation of the area 24. Somatic reactions elicited from the caudate nucleus and the area 24 were accompained by vegetative reactions of qualitatively the same direction.

The possible mechanism of the functional connections of the two regions and the role played by vegetative factors in the effector function of the cortex is briefly discussed.

LITERATURE

1. *Akert, K., Andersson, B.:* Acta Physiol. Scand. **22/2—3**, 281 (1951).
2. *Clark, G., Kao Liang Chow, Gillaspy, C. C.* and *Klote, D. A.:* J. Neurophysiol. **12**, 459 (1949).
3. *Danilewsky, B. Jr.:* Pflüg. Arch. ges. Physiol. **11**, 128 (1875).
4. *Dusser de Barenne, J. G., Garol, H. W.* and *McCulloch, W. S.:* Res. Publ. Ass. nerv. ment. Dis. **21**, 246 (1942).
5. *Dusser de Barenne, J. G.* and *McCulloch, W. S.:* J. Neurophysiol. **4**, 311 (1941).
6. *Grastyán, E., Lissák, K., Hasznos, T., Molnár, L.:* Acta Physiol. Hung. **4**, 241 (1953).
7. *Hodes, R., Peacock, Jr. S. M., Heath, R. G.:* J. comp. Neurol. **94/3**, 381 (1951).
8. *Kaada, B. R.:* Acta Physiol. Scand. *Suppl.* 83 (1951).
9. *Laidlaw, A. E.* and *Kennard, M. A.:* Amer. J. Physiol. **129** 650 (1940).
10. *McCulloch, W. S., Graf, C.* and *Magoun, H. W.:* J. Neurophysiol. **9**, 127 (1946).
11. *Mettler, F. A., Ades, H. W., Lipman, E.* and *Culler, E. A.:* Arch. Neurol. Psychiat. Chicago, **41**, 984 (1939).
12. *Ward, A. A. Jr.:* J. Neurophysiol. **11**, 13 (1948).

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ ПОЯСНОЙ ИЗВИЛИНОЙ И ХВОСТАТЫМ ЯДРОМ У КОШЕК

Е. Граштян, К. Лишшак, Л. Мольнар

Физиологический институт медицинского университета, г. Печ

Резюме

При исследовании функциональной связи локализации хвостатого тела авторами было установлено, что в более широкой латеральной части головки хвостатого тела с помощью электрического раздражения можно выявить соматомоторную систему торможения, а в его медиальной части систему фацилитации. Объектом процессов торможения и фацилитации служили движения передних конечностей, вызванные с моторной коре, зарегистрированные кимографическим способом, также как и самопроизвольные движения животных. Этой двояковой организованностью хвостатого тела выдвинулось возможность, что за также двоякую, но топически неотделимую функцию поясной извилины — функционально тесно связанной с хвостатовым телом — ответственным является целостность функционально единых областей головки хвостатого тела. Электрическими коагуляциями удалось доказать, что массивное нарушение латеральной части хвостатого тела (в случае невредимости медиальной части) — при одинаковых условиях раздражения, — прекращает или поворачивает соматомоторное торможение, вызванное предварительно в поясной извилине, т. е. приводит к фацилитации. Повреждением медиальной области получается обратный результат описанного явления. Авторами установлено закономерный параллелизм соматомоторных и вегетативных реакций, вызываемых в хвостатом ядре и в поясной извилине. Торможение сопровождено со сигнификантной статистической вероятностью вегетативными реакциями парасимпатического, а фацилитация вегетативными реакциями симпатического направления. На основе достигнутых результатов авторами сделан вывод по элективной, тонизирующей роли вегетативных факторов, проявляющихся в коре.

ROLE OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN THE REGULATION OF THE PITUITARY-ADRENOCORTICAL SYSTEM

By

E. ENDRŐCZI and K. LISSÁK

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY OF THE MEDICAL UNIVERSITY, PÉCS

(Received, October 24, 1952)

Nearly ten years after the publication of *Cannon*'s theory (1) of emergency function a new concept was formulated by *Selye* (2), based on the pituitary-adrenocortical system and involving the whole endocrine system. According to the »general adaptation syndrome« the pituitary-adrenal cortex is activated by all noxious stimuli. With the accumulation of data on the function of the pituitary-adrenocortical system it became clear that the system exerts a specific regulatory influence in adaptation.

From the point of view of *Pavlovian nervism* one must consider that neither of the adaptation theories includes the organism as a whole. *Cannon*, in the absence of sufficient data had failed to extend his concept to other endocrine factors, whereas *Selye*'s adaptation theory did not involve neural factors, which play a very important role in adaptation.

Many kinds of stress based on psychical and exteroceptive stimuli clearly indicate that the central nervous system exerts a direct regulatory influence on the pituitary-adrenocortical system. In our laboratory *Endrőczi and Nagy* (3) have demonstrated that lymphopenia caused by heat or adrenaline is abolished by prefrontal leucotomy. The relation between higher nervous activity and the pituitary-adrenocortical system was indicated by *Weisz* and his coworkers (4). They observed that in rats conditioned stimuli may cause a decrease in the ascorbic acid content of the adrenal cortex. In the present paper we shall deal partly with some genetical specialities of the pituitary-adrenal function and partly with its neural regulation and organisation.

Methods

The experiments were carried out on rats, guinea pigs, rabbits, dogs and cats and also on patients suffering from mental disorders. Ascorbic acid was determinated by the method of *Roe* and *Keuther* (5). The blood obtained from the tail-vein of rats and from the ear-vein of other animals was diluted with Türck's solution and cells were counted on all squares of each side of a Bürker's cell. The relative lymphocyte count was established in blood-smears stained with May—Grünwald—Giemsa's solution, counting in each case at least 200 cells. The limit of error in the case of a 20 per cent relative lymphocyte count (RLC) remained within 10 per cent, in the case of a 40 per cent RLC within 6 per cent, and over 70 per cent RLC within 4 per cent. It was established in control experiments

that the lymphocyte levels expressed in terms of absolute lymphocyte count (ACL) in blood samples taken from the heart, the ear-vein, the mesenterial vein, and the femoral artery agree within 10 per cent both at rest and in stress. As stressors, adrenaline hydrochloride, histamine hydrohcloride, a chamber of 42 to 45 C, refrigerator of 0 to 2 C, in some experiments adrenocorticotrophin (Cortrophine, Organon Oss) were employed. Blood samples for the analyses were taken at the beginning and in the 3rd hour.

Results

Earlier observations already contain data indicating that the pituitary-adrenal system of some animal species may show both quantitative and qualitative differences. *Rogers and Richter* (6) registered a significant difference between the weights of the adrenal glands of wild and domesticated rats. In comparative investigations we have found differences also in the adaptive apparatus of some laboratory animals. Table I shows the mean values and standard deviations of WBC, RLC, ALC and the quotiens, spleen per body weight and adrenal gland per body weight, of different animal species. Calculation of the indices has been based on the following formula :

$$Q = \frac{\text{Weight of adr. gland in mg}}{\text{Body weight in gm}} \quad \text{OR} \quad \frac{\text{Spleen weight in mg}}{\text{Body weight in gm}}$$

Table I shows that whereas rodents display a characteristically high lymphocyte count, the blood of dogs, cats and of man has a comparatively low lymphocyte count. The guinea pig, in comparison with other animals has a multiple adrenal per body weight quotient. As considered on the basis of the spleen per body weight index, the rabbit has a relatively small spleen and at the same time a low storing capacity for lymphocytes (Table I).

TABLE I

Mean values and standard deviations of total white blood cell counts, relative lymphocyte and absolut lymphocyte counts and of adrenal, viz. spleen per body weight quotients in different laborator animals. Means are calculated from 15 cases each.

	Rat	Guinea-pig	Rabbit	Cat	Dog
WBC in cmm	14,400 ±3,200	9,000 ±2,700	7,600 ±2,400	8,800 ±2,200	9,000 ±2,800
RLC	62—72	70—84	58—70	22—30	18—26
ALC in cmm	9,380 ±2,450	6,900 ±2,300	4,620 ±1,450	2,280 ±0,850	2,120 ±0,550
Q of adrenal	0,14 ±0,02	0,35 ±0,024	0,12 ±0,028	0,11 ±0,012	0,05 ±0,014
Q of spleen	3,3	2,9	0,26	2,5	3,7

We examined further the changes arising in the number of circulatin lymphocytes after administration of adrenaline hydrochloride (0,1 mg pe

kg of body weight, subcutaneously) in different animals. It was established that the rat, the cat and the dog give a lymphopenic response of the same order of magnitude. An extreme lymphopenia was found in guinea pigs, which have a high adrenal per body weight ratio. The rabbit, having a low spleen per body weight index, reacts sometimes with lymphopenia and in some cases inversely with lymphocytosis. Lymphopenia following ACTH, (a single dose of 50 μg per kg, intravenously) was of the same order as the one observed after adrenaline and it elicited also in rabbits in every case a lymphopenic response of a similar magnitude. This indicates that in the response to adrenaline another humoral or nervous factor may be involved.

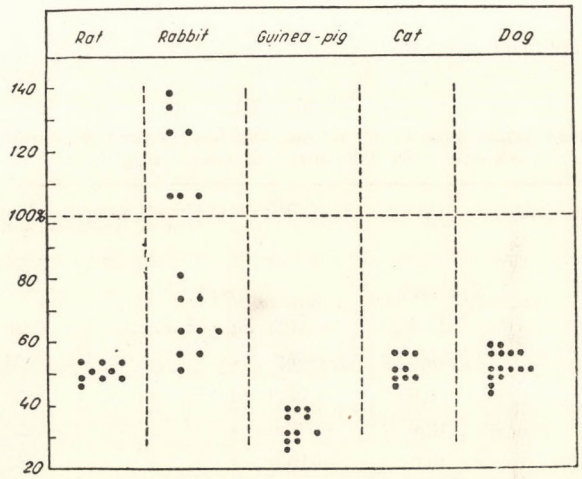


Fig. 1. Percentual changes in the absolute lymphocyte count following injection of adrenaline in different laboratory animals. The means have been calculated from 15 cases each.

Table II shows the decrease of the ascorbic acid contents in different species after intraperitoneal injection of 0.5 mg of adrenaline per kg. There is a marked difference in the ascorbic acid level according to species. The guinea pig, in which ascorbic acid plays the role of a vitamine, shows the lowest values. The percentual decrease of the level of ascorbic acid also gives significant differences between the single species. Most sensitive to adrenaline stress is the rat, while the cat, the dog, and the rabbit display a lower sensitivity (Table II).

The adrenal cortex of the gray Belgian rabbit contains double the amount of ascorbic acid than that of the albino rabbit and the decrease elicited by adrenaline is also marked.

A further problem was the investigation of the neural organisation of the pituitary-adrenocortical system. It has been found that stimulation of the frontal area of the cortex activates electively the mechanism mentioned above (7). The fact that the effect remains unchanged after section of the splanchnic nerve,

TABLE II

Mean values and standard deviation of adrenal ascorbic acid content and depletion in the same animals

No of animals	Mean and S. D. before adm. of adrenaline	Species	No of animals	Mean and S. D. after adm. of adrenaline
25	440±28	Rat	20	250±31
9	152±10	Rabbit (albino)	8	140± 9
12	254±14	Rabbit (gray)	8	205±12
11	124± 8	Guinea-pig	8	95±20
14	128±11	Cat	8	86±12
13	148± 9	Dog	13	132±14

S. D. standard deviation.

TABLE III

Adrenal gland per body weight quotient of normal and leucotomized dogs and decrease of adrenal ascorbic acid following adrenaline injections

Body weight g / Adrenal w. mg	index	Decrease of adrenal ascorbic acid after administration of 0,1 mg/kg adrenaline	
Normal	Operated	Normal	Operated
15,0	11,0	—16,0 mg per cent	—28,0 mg per cent
42,4	15,0	— 6,0 «	—28,0 «
22,6	8,8	—24,0 «	—22,0 «
16,5	12,0	—22,0 «	—27,0 «
23,0	10,0	—10,0 «	—27,0 «
28,0	12,0	—12,0 «	—43,0 «
18,0	8,7	—24,0 «	—37,0 «
19,0	15,0	—25,0 «	—19,0 «
11,0	8,0	—10,0 «	—28,0 «
Mean 20,3	11,3	—13,0 mg per cent	—29,0 mg per cent

suggests a hormonal mechanism. After severing the fronto-subcortical fibres lymphocytosis instead of a lymphopenic response was observed in various stresses. This inversed reaction resembles the one observed in mental patients by *Pincus and Elmadjian* (8), according to whom these patients suffer from adrenal insufficiency. In subsequent studies, changes in the adrenal cortex were observed during development of this inverse reaction. Fig. 3 demonstrates the changes in the absolute lymphocyte count observed in leucotomized dogs following the administration of adrenaline and ACTH.

It is of special interest that adrenaline elicits lymphocytosis while administration of ACTH is followed by a more marked lymphopenia than in normal

animals. These investigations were carried out on 42 leucotomized and 32 normal dogs. The development of inverse reactions is a progressive one, reaching its maximum during the 2nd or 3rd week following leucotomy to be maintained for several months. Threshold doses of adrenaline diminishing the ascorbic acid content with less than 15 mg per cent in normal dogs, markedly reduced the ascorbic acid level in leucotomized animals. The adrenals of the operated animals were found to be enlarged after 2 to 3 weeks. These findings suggest

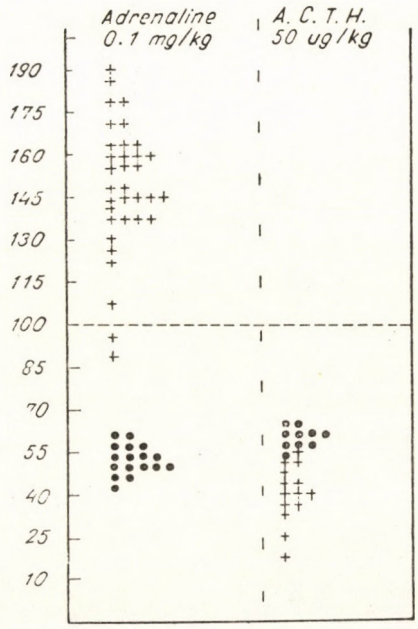


Fig. 2. Percentual changes in the absolute lymphocyte count in normal and leucotomized dogs after administration of adrenaline and ACTH.

that the adrenals of leucotomized dogs react more readily to stimuli in this aspect than those of the normal dog.

The dissociated lymphocyte reaction to adrenaline and ACTH suggests that the function of the pituitary-adrenocortical system is not disturbed and that the course of the dissociation must be sought at a suprapituitary level. Adrenaline seems to act not only on the ACTH-adrenocortical system, but also on those subcortical mechanisms which modify the mobilization of ACTH. The altered hormonal effect in leucotomized animals is due changes in the central nervous activity, resulting not only in an inverse lymphocyte reaction, but also in increased accumulation of lipoid and cholesterol in the adrenal cortex. The photomicrographs demonstrate the lipoid and cholesterol content of the adrenal cortex in normal and leucotomized dogs. (Scarlet Rand Schultz's stain.)

Histochemical examinations of the anterior pituitary lobe by means of McManus—Hotchkiss' periodic acid-fuchsin stain showed that the glycoprotein

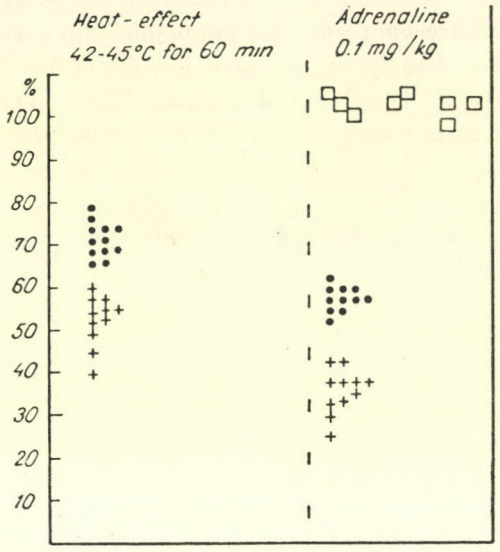
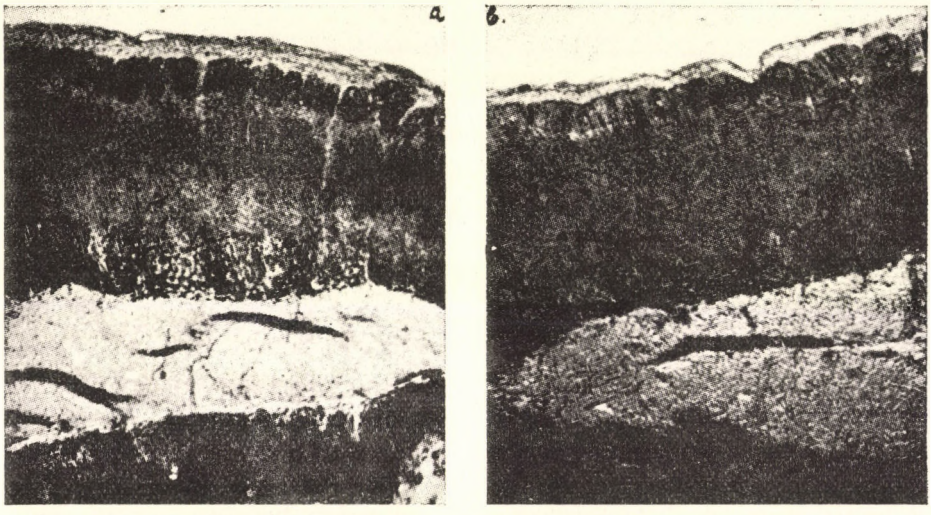


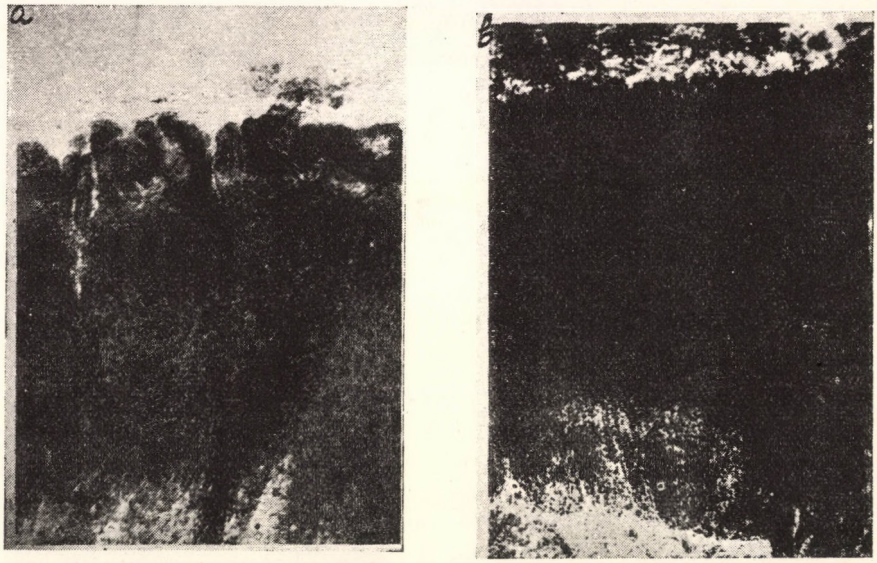
Fig. 3. Percentual changes in the absolute lymphocyte count elicited by heat and adrenaline in normal and benzedrine treated dogs. Signs: • normal animals; + benzedrine treated; □ benzedrine treated controls



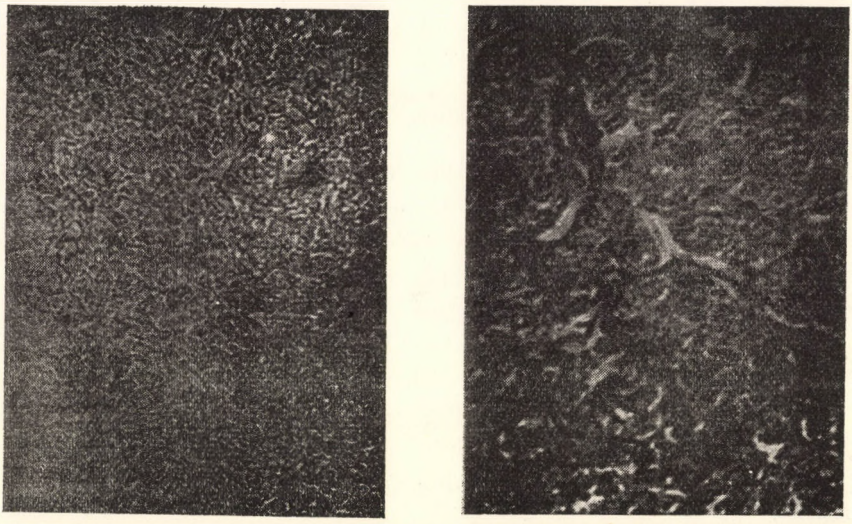
Photomicr. 1. Adrenal cortex:- *a)* normal, *b)* leucotomized. Scarlet R. stained. Magnification, 90. Frozen sections

content is increased in leucotomized dogs. According to recent investigations a positive staining is indicative of gonadotrophine, although *Catchpole* (9, 10)

and other investigators could demonstrate also the presence of thyreotropic hormone in the parts giving a positive reaction.



Photomicr. 2. Adrenal cortex: *a)* normal, *b)* leucotomized. Schultz's stain. Magnification, 90. Frozen section

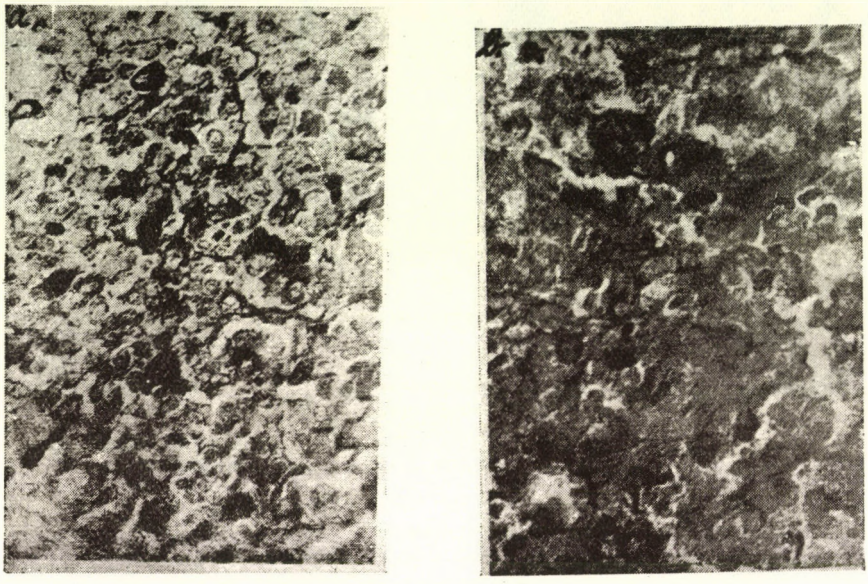


Photomicr. 3. Anterior pituitary lobe: *a)* normal, *b)* leucotomized. Stained with periodic acid-fuchsin Magnification, 90. Paraffin sections

Photomicrographs 3 and 4 show accumulation of glycoprotein in the anterior pituitary of leucotomized dogs. Considering the data cited above, no

inference can be drawn as to the involvement in these changes of the functions of either of the trophormones mentioned. It may, at least in part, be a sign of the hormonal »shift« claimed by *Selye* (11).

We must, on the other hand, suppose that the development of adaptation to endogenous stresses is modified by the central nervous system. By a dose of benzedrine (1,0 mg per kg of body weight, subcutaneously) failing to



Photomicr. 4. Anterior pituitary lobe: *a)* normal, *b)* leucotomized. Stained with periodic acid-fuchsin. Magnification, 300. Paraffin sections

influence the lymphocyte count within 3 hours, the fall in the lymphocyte count produced by heat or adrenaline injections is still markedly enhanced. In acute experiments the pituitary-adrenocortical system is also activated by benzedrine. According to our opinion, this effect is produced by activation or modification of the ACTH mobilization via the subcortical vegetative centres. If 6 to 8 injections of adrenaline were administered in 8 hour intervals, an inverse lymphocyte reaction develop. This confirms the data of *Last, Jordan and Pitesky* (12) regarding circulating eosinophils. Fig. 5 shows that no adrenocortical insufficiency occurred in the animals as a normal response to other stresses, e. g. to histamine, observed during the inverse adrenaline reaction.

The ability of histamine to produce lymphopenia while the inverse reaction to adrenaline persists, shows that the action of histamine on the anterior pituitary is not being mediated by adrenaline and that therefore adrenaline is not only mediator in eliciting the secretion of ACTH.

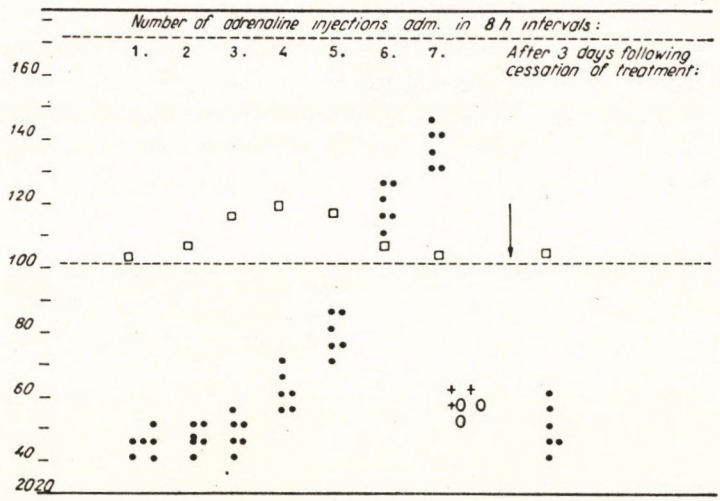


Fig. 4. Percentual changes in the absolute lymphocyte count before and after administration of adrenaline repeated in 8 hour intervals. The count was made 3 hours after the injection. After the 7th dose of adrenaline, a lymphopenic response induced by histamine or ACTH is shown. Signs.: □ before adrenaline; + change 3 hours after injection of 0,1 mg/kg of histamine; . change 3 hours after injection of 0,1 mg/kg of adrenaline; ○ ∅ change 3 hours after intravenous injection of 50 g/kg of ACTH.

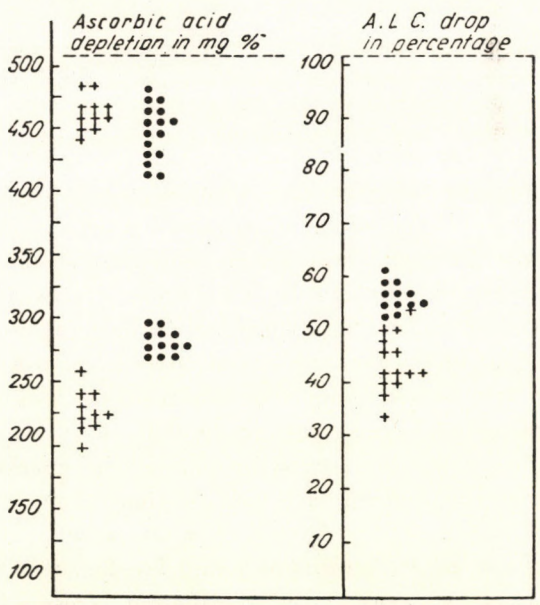


Fig. 5. Decrease of adrenal ascorbic acid content and percentual changes of the absolute lypmhocyte count in frontal leucotomized rats following administration of 0,5 mg/kg adrenaline. Signs: + leucotomized rats; . normal rats.

Experiments essentially similar to those carried out in leucotomized dogs were performed on rats 20 to 30 days following removal of the frontal poles of the brain. An exaggerated decrease in the ascorbic acid content of the adrenal cortex was observed. The fall was the most marked in the 3rd week. The changes in the lymphocyte count following enviromental stimuli showed, in contrast with the experience on dogs, no inverse reaction but lymphopenia was more marked than in the control animals.

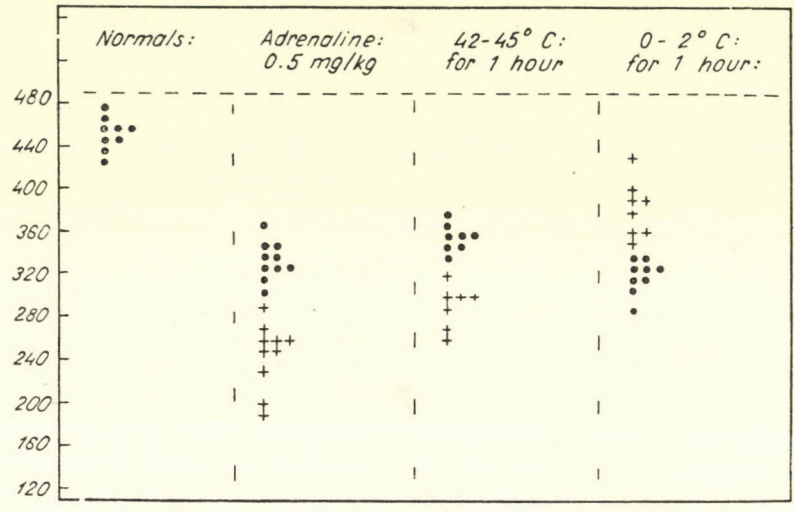


Fig. 6. Changes of adrenal ascorbic acid in normal and leucotomized rats elicited by diverse noxious stimuli. Signs: as fig. 5.

Our findings have confirmed the observations of *Greene* and his coworkers (13) according to which frontally leucotomized rats respond with a lengthened and more marked lymphopenia than control animals. The discrepancy of the lymphocyte reactions in leucotomized dogs and rats does not depend on the type of surgical procedure performed, as leucotomies carried out in different planes of the frontal lobe or removal of isolated frontal areas always resulted in inverse lymphocyte reactions in the dog. The response to different noxious stimuli of leucotomized rats is very characteristic. The decrease of the ascorbic acid content of the adrenal cortex is more marked after administration of adrenaline or exposure to heat and less marked after exposure to cold, while after administration of histamine no difference could be observed between normal and leucotomized animals. The fact that following removal of the frontal cortex the sensitivity to different stresses becomes different evidently shows that the altered response must be ascribed to changes in the neural mechanism.

Pincus and Elmadjian (8) found in a high percentage of schizophrenic patients an inverse lymphocyte reaction to psychical stress. The investigations have therefore been extended to patients suffering from schizophrenia, genuine and traumatic epilepsy, and also healthy subjects. Adrenaline (0,35 mg subcutaneously) and ACTH (3,0 mg of Cortrophine, Organon, intravenously) were injected. In healthy individuals weighing 60 kg the drugs in the doses applied elicit a similar lymphocytic response. Schizophrenics responded to adrenaline either with an inverse reaction or with a less marked fall. The

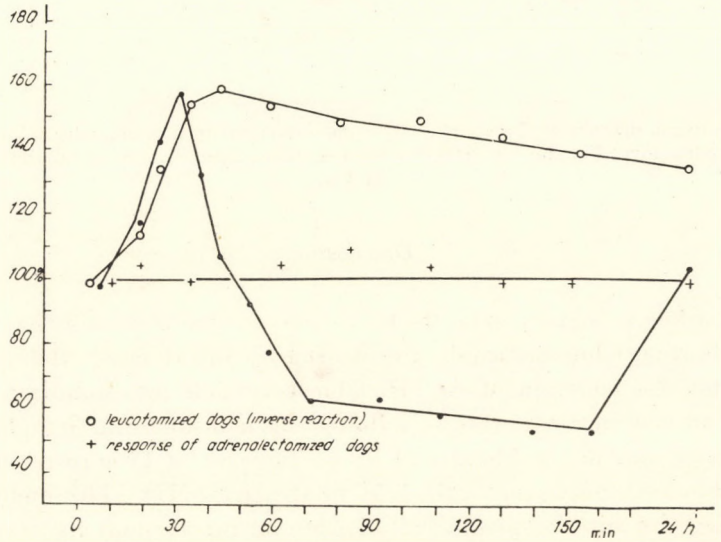


Fig. 7. The mean normal and pathological lymphocyte response to adrenaline : Signs : • normal dogs ; ○ leucotomized dogs (inverse reaction) ; + response of adrenalectomized dogs.

lowered response is preceded by a prolonged initial lymphocytosis. Under normal conditions the lymphocytic reaction consists, as it has been found in accordance with other authors (14, 15), in a marked lymphocytosis lasting 30 to 40 minutes and being followed by an absolute lymphopenia in the 2nd hour. In certain pathological conditions of the central nervous system the lymphocytosis may persist for 3 or even for 24 hours.

The inverse reaction observed in schizophrenic patients is not an adrenocortical insufficiency, for they usually react with a normal response to ACTH. In the major part of leucotomized patients examined 3 to 6 months after the intervention, the inverse response was not present any more, some of them even responded with increased lymphopenia to both adrenaline and ACTH.

Patients, suffering from genuine or traumatic epilepsy, in whom seizures had not been observed for some time, reacted with an increased lymphopenia to both adrenaline and ACTH.

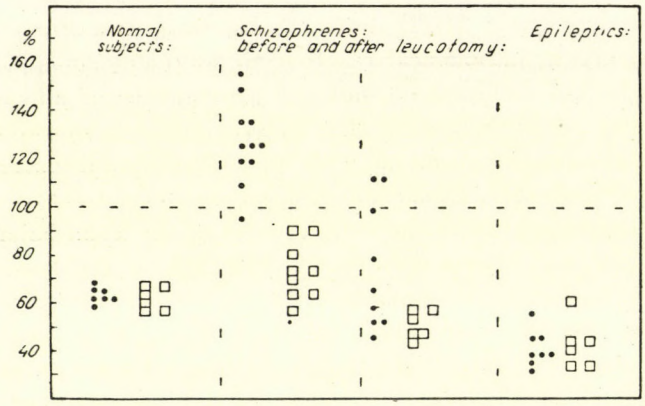


Fig. 8. Percentual changes of the absolute lymphocyte count in normal, schizophrenic, epileptic individuals following adrenaline or ACTH administration. Signs : . after adrenaline ; □ after ACTH.

Discussion

According to literary data, the basic steps of adaptation may be summarized in the following. Glucocorticoids are utilized by the tissues ; this represents a stimulus for the secretion of ACTH. Glucocorticoids are mobilized by ACTH from the adrenal cortex ; this is followed by a decrease of lymphoid, of the lymphocyte count in the blood and by an increase of 17-ketosteroids, neutral lipid soluble substances and uric acid in the urine (11). The mobilization of ACTH from the anterior pituitary following an intravenous injection of adrenaline or histamine is a very rapid process. *Gray and Munson* (16) found that within 7 to 10 seconds after intravenous injection of histamine a decrease of the ascorbic acid level of the adrenal cortex is brought about by ACTH. The rapidity of the effect excludes the possibility that adrenaline or histamine would act on the utilization of glucocorticoids.

According to our opinion, the lympholytic activity of glucocorticoids plays an inportant role in adaptation. Our calculations show that a single subcutaneous injection of 0,1 mg of adrenaline per kg body weight results in the migration of two to three hundred millions of lymphocytes. *Dougherty and White* (17) have demonstrated the important role of lymphocytes in the synthesis and storage of antibodies. Literary data show that lymphocytolysis takes place not in the blood-stream but in the tissues. The mechanism of the lytic process is unknown (18, 19).

A number of reports have dealt with the value of the lymphocyte reaction as a clinical diagnostic test (20, 21). To that purpose observation due to a specific stress is not suitable, but recording of the lymphopenic reaction to both adrenaline and ACTH under standard conditions may serve as a valu-

able diagnostic test of adrenocortical function. The discordance between the reactions to adrenaline and ACTH shows, that even in case of a normal adrenal response to ACTH, a pathological reaction to adrenaline may occur. This is, as was shown by our experiments, not the consequence of an adrenocortical insufficiency, but sooner indicative of a dysfunction at a suprapituitary level.

The neural factors concerned with the pituitary-adrenocortical system have been scarcely cleared. *Hume* (22) showed that for activation of theACTH-adrenal system the integrity of the ventral area of the hypothalamus is indispensable. *DeGroot and Harris* (23) found inhibition of the lymphopenia response following lesions of the mamillary body and the tuber cinereum. *Hume and Wittenstein* (24) suggested that secretion of ACTH is regulated by the N. paraventricularis. It is interesting that in Cushing's disease or after administration of glucocorticoids degenerative changes may be observed in the same area (25, 26). The data mentioned above tend to show that the hypothalamus is under the direct control of the pituitary adrenocortical system.

The changes ensuing in consequence of frontal leucotomy may be interpreted in two ways, i. e. the frontal cortex plays a direct role in adaptation, or interruption of the fronto-cortical connections results in a new coordination of the vegetative centres influencing the humoral system. It seems improbable that the frontal cortex, being considered as the cortical representation of the ventral hypothalamus, could play a direct role in the activation of ACTH secretion. Section in different planes of the fronto-subcortical connections shows that the effect depends only on the number of fibres interrupted and it is indifferent, whether the leucotomy was performed through the parietal or the orbital areas. It may be supposed that the interruption of fronto-subcortical connections results in a new functional state of the vegetative centres. This may be interpreted also according to the »law of denervation« formulated by *Cannon* (27).

The deafferentation of some cortical areas results in a decrease of the number of impulses arriving from other centres or cortical areas and consequently reduces the possibility of information available and increases the sensitivity and the ability to respond to chemical mediators and to impulses arriving through intact neural connections (28). According to our opinion, the changes in activity of the pituitary-adrenocortical system occurring after leucotomy arise in consequence of the denervation, by which process the sensitivity of subcortical vegetative centres is increased and an increased activation of the pituitary-adrenocortical system is induced. Epileptic patients exhibiting abnormal responses also show that this function is under the direct influence of the subcortex. According to *Went*'s investigations (29), in patients suffering from genuine epilepsy the cholesterol content of the adrenal cortex surpasses with about 300 per cent that of healthy subjects. These data serve to confirm our results and it may be supposed that the pathological responses, observed

in the above experiments as well as in epileptics, arise in consequence of the changed sensitivity of the subcortical centres.

Summary

The response to various stressing agents as measured with the lymphocyte count and the ascorbic acid depletion test, characteristically differ in the different species. Leucotomy in dogs is followed by an increase in the weight of the adrenal gland, an increased content of lipoid and cholesterol, by an exaggerated ascorbic acid depletion after administration of adrenaline, and by a more marked lymphopenic reaction to ACTH. Leucotomized dogs respond to adrenaline with lymphocytosis, while ACTH elicits a normal, or even a marked lymphopenic response. The difference is being attributed to neural factors. Following removal of the frontal poles, similar changes were observed in rats, except the inverse lymphocyte reaction. In patients suffering from mental disorders a dissociation of the lymphocyte reactions disappearing after leucotomy was also observed. Epileptic patients tested by the lymphocyte reaction show an increased response of the pituitary-adrenocortical system.

LITERATURE

1. *Cannon, W. B.:* Erg. Physiol. **27**, 38 (1928).
2. *Selye, H.:* Endocrinology, **21**, 169 (1937).
3. *Endrőczi, E.* and *Nagy, D.:* Acta Physiol. Hung. **2**, 11 (1951).
4. *Weisz, P., Glatz, E., Kertai, P., Wasenszky, S., Schultz, A.* and *Szendi, A.:* Orvos Hetilap **14**, 409 (1952).
5. *Roe, H. J.* and *Keuther, C. A.:* J. Biol. Chem. **147**, 399 (1943).
6. *Rogers, P. V.* and *Richter, C. P.:* Endocrinology, **42**, 46 (1948).
7. *Csordás, J., Endrőczi, E.* and *Lissák, K.:* Acta Physiol. Hung. **3**. 75 (1952).
8. *Pincus, G.* and *Elmadjian, F.:* J. Clin. Endocrinol. **6**, 258 (1946).
9. *Catchpole, P. J.:* J. of Endocrinol. **35**, 49 (1949).
10. *Catchpole, P. J.:* ibidem **36**, 72 (1950).
11. *Selye, H.:* »Stress« Acta Med. Montreal, 1949.
12. *Last, J. H., Jordan, P. A., Pitesky, I.* and *Siegel, B.:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **74**, 96 (1950).
13. *Greene, M., Measer, M.* and *Swinyard, C. A.:* Anat. Record. **103**, 123 (1949).
14. *Endrőczi, E.* and *Nagy, D.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 69 (1952).
15. *Endrőczi, E.* and *Lissák, K.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 85 (1952).
16. *Gray, W. D.* and *Munson, P. L.:* Endocrinology **48**, 471 (1951).
17. *Dougherty, T. F.* and *White, A.:* Endocrinology **35**, 1 (1944).
18. *Hechter, O.:* Endocrinology **42**, 285 (1948).
19. *Hechter, O.* and *Johnson, S.:* Endocrinology **45**, 351 (1949).
20. *Hills, G. P., Forsham, H.* and *Finch, C. A.:* Blood **3**, 755 (1948).
21. *De Fossey, B. M.* and *Deltour, G. H.:* Ann. endocrinol. **11**, 341 (1950).
22. *Hume, D. M.:* J. Clin. Invest. **28**, 290 (1949).
23. *De Groot, J.* and *Harris, G. W.:* J. Physiol. **11**, 335 (1950).
24. *Hume, D. M.* and *Wittenstein, G. F.:* »Clinical ACTH« The Blakiston Co.
25. *Caster, W. L., Burton Dwight, Ingle, J.* and *Choh Hao Li:* Proc. Soc. Exp. Biol. **76**, 353 (1951).
26. *Heinbecker, P.* and *Pfeiffenberger, M.:* Amer. J. Med. **9**, 3 (1950).

27. *Cannon W. B.* and *Rosenblueth, A.:* Th supersensitivity of denervated structures, New York, 1949.
28. *Lissák, K., Endrőczi, E.* and *Hasznos, T.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 38 (1952).
29. *Went, G.:* Arch. Psychiat. Nervenkrank. **183**, 418 (1949).

ИССЛЕДОВАНИЯ НЕРВНО-ЭНДОКРИННЫХ КОРРЕЛЯЦИЙ РОЛЬ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ СИСТЕМЫ ГИПОФИЗ — КОРА НАДПОЧЕЧНИКА

Е. Эндрэци и К. Лишшак

Физиологический институт медицинского университета, г. Печ

Р е з ю м е

Результаты исследований, проведенных авторами относительно нервно-эндокринной системы следующие:

1. У отдельных лабораторных животных можно выявить различия функции системы гипофиз — кора надпочечника.

2. У собак, после выключения фронтальной части коры головного мозга, система гипофиз — кора надпочечника активизируется; эта активизация проявляется в повышении накопления липоидов, в уменьшении содержания аскорбиновой кислоты во время адреналиновой нагрузки, также как и в повышении лимфопении после подачи АСТН.

3. У лейкотомизированных собак, диссоциированную реакцию лимфоцитов, возникающую после подачи АСТН и адреналина, можно рассматривать как вследствие измененной подкорковой организации.

4. У крыс, после удаления лобной части коры головного мозга, авторам удалось установить подобные результаты как у собак.

5. В случаях психозов, как например у большинства случаев шизофрении, обнаружено наличие диссоциированной реакции лимфоцитов, нормализирующейся в одной части случаев после лейкотомии.

6. При помощи реакции лимфоцитов у эпилептиков можно выявить повышенную активность системы гипофиз — кора надпочечника.

THE EFFECT OF STEROID-COMPOUNDS ON THE NEUROMUSCULAR SYSTEM

I. EFFECTS IN VITRO ON THE STRIATED MUSCLE OF THE FROG

By

E. ENDRŐCZI and A. TIGYI

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY OF THE MEDICAL UNIVERSITY, PÉCS

(Received, July 9, 1952)

The endocrine reactions play an important role in the functioning of the neuro-endocrine system. Protein-like hormones alter the function of the neuromuscular system by means of their general metabolic effect. On the other hand, the effect of steroids must be considered differently owing to the fact that various tissues show various sensitivity in their response to the action of steroids which substances seem to have no general metabolic effect.

Little is known about the metabolic role of steroids and it is still problematic whether they act directly on cell-metabolism or through alteration of the permeability of cells.

The present investigations were carried out in order to examine in vitro the effect of adrenocortical and sexual steroid hormones on the contraction produced by acetylcholine on the rectus abdominis muscle of frogs.

Methods

The experiments were carried out on the rectus abdominis muscle of Rana esculenta from January until June. The isolated muscle was suspended under constant O_2 flow in a vessel measuring 12 ml, filled with *Ringer*'s solution containing 0,65 g of $NaCl$, 0,02 g of KCl, 0,02 g of $CaCl_2$, and 0,1 g of $NaHCO_3$, in 100 ml of water. Before eliciting contraction with acetylcholine, the muscle had been treated for 5 minutes with eserin sulphate (1 : 25 000). Acetylcholine contractions had been registered by means of a stopped kymograph for 60 seconds. The muscle was then washed 6 to 7 times within 10 minutes before beginning the next experiment. The substances to be examined were added to the bath 5 minutes before the addition of acetylcholine.

In the course of the experiments the following steroid hormones and derivatives were tested. 11-desoxycorticosterone (Ciba), dehydrocorticosterone (Schering), progesterone (Ciba), pregnenolone (Schering), testosterone propionate (Ciba), stilben-dipropionate (Richter), cholic acid and glycocholic acid. As a control substance, cholesterol was used. A 1 mg/ml alcoholic solution was prepared of these compounds. After ascertaining that alcohol in itself exerted practically no effect, amounts of 0,1 ml or 0,2 ml of the solutions to be tested were added to the bath. In the Table, the different effects observed are shown on ground of a percentual analysis of the height of curves. The mode of the drawing technic is demonstrated in *Fig.* 1.

Results

The steroids used in the observations were of corticoid, luteoid, folliculoid and testoid character or they belonged to the group of cholic acids. According

to the results, the steroids tested have a specific effect, which may be either negative or positive. Most of the steroids were added in a concentration of 10^{-6}. Some substances exerted an inhibiting or an increasing effect even after washing the muscle, while normalization could be evidenced only after often repeated washing. This may be due to the fact that the solubility of the examined materials

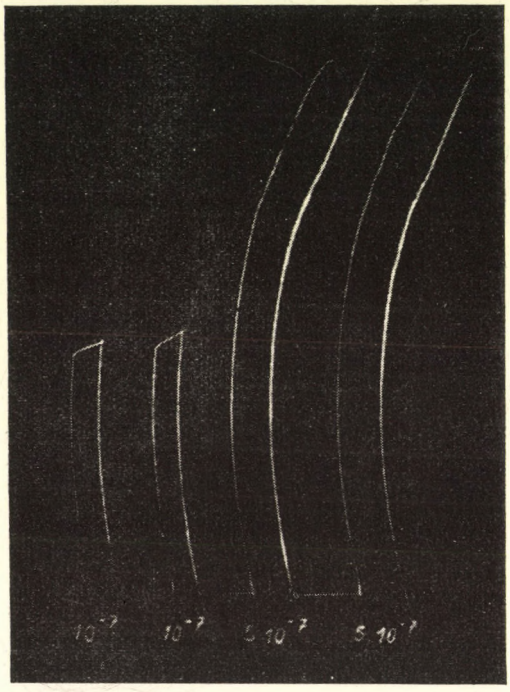


Fig. 1. Contraction of the rectus abdominis muscle of the frog, elicited by acetylcholine in concentrations of 10^{-7} and $5{,}10^{-7}$, recorded on a stopped kymograph for 60 seconds.

in *Ringer*'s solution is relatively low and they resist washing after being dissolved in the lipids of muscle tissue.

According to the results, the effect of steroids are on muscle contraction elicited by acetylcholine exhibits a group specificity. Table Ishows that the greatest depressive effect is exerted by luteoids and 11-desoxycorticosterone with mineralo-corticoid activity, and in a lesser degree by testoids.

It is generally known that sexual steroids capable of exerting synergic and antagonistic effects both on gonadal and extragonadal structures (1). Such group-effects could be observed even in the course of the present simple in vitro

TABLE I

The effect of corticoid, luteoid, folliculoid testoid hormones and their derivatives on the acetylcholine contraction of the rectus abdominis muscle of the frog in vitro.

Compound	Amount of acethyl choline used	Effect of add. subst. in %	Dilution of added subst.	Biological effect
Dehydrocorticosterone	$5{,}10^{-7}$	—24%	10^{-6}	Glucocorticoid
		—26%	10^{-6}	
11-desoxycorticosterone	$2{,}10^{-7}$	—29%	10^{-6}	Mineralocorticoid
	$5\ 10^{-7}$	—25%	10^{-6}	
	10^{-6}	—36%	$2{,}10^{-6}$	
a-oestradiol	$5{,}10^{-7}$	+49%	$2{,}10^{-6}$	Folliculoid
	10^{-6}	+30%	10^{-6}	
Progesterone	$5{,}10^{-7}$	—45%	10^{-6}	Luteoid
	10^{-6}	—42%	10^{-6}	
4,4-dioxy-alfa-beta-diaethyl-stilben-di-propionate	10^{-6}	+83%	$2{,}10^{-6}$	Folliculoid
	10^{-6}	+52%	10^{-6}	
Testosterone-propionate	$5{,}10^{-7}$	—36%	10^{-6}	Testoid
	10^{-6}	—37%	10^{-6}	
Dehydro-iso-androsterone			ineffective	
Pregnenolone			ineffective	
Cholic acid (trioxycholanic acid)			ineffective	
Glycocholic acid			ineffective	
Cholesterol			ineffective	

experiment. Similar effects on the biological structure were evidenced in the experiments with oestradiol and stilben derivatives. These substances have similar biological actions although their molecular structure is different.

The fact that pregnenolone, dehydro-iso-androsterone, cholesterol, and cholic acid in the concentration used had no effect on acetylcholine contraction suggests that the effects observed were of a specific biological character.

Recent investigations carried out in our institute (2, 3) lead to the conclusion that the effect of steroids on the action of smooth muscle is group-specific. This confirms the earlier literary data that luteoid and folliculoid steroids have antagonistic actions.

According to various authors, the actions of steroids on smooth-muscle contraction are in part surface effects. On the basis of the present results, it is possible that such rapid effects are of a surface character and do not influence the metabolic processes of the cells.

According to our opinion, the rapid effect of steroid hormones plays an important rôle also in higher organisms. The effect is probably of a surface character which, as a causal factor, may effect both gonadal and extragonadal influences.

Summary

The effect of corticoid, luteoid, folliculoid, testoid hormones and their derivatives on the acetylcholine contraction of the rectus abdominis muscle of the frog was investigated in vitro. Luteoid, testoid, corticoid-like steroids exerted an inhibiting effect, while folliculoids an increasing action. Cholic acid and its derivatives, as well as cholesterol, were ineffective.

LITERATURE

1. *Selye, H.:* Textbook of Endocrinology, Acta Endocrinologica, Montreal, 1947.
2. *Nagy, D.* and *Lissák, K.:* Acta Physiol. Hung. **1**, 44 (1950).
3. *Lissák, K., Nagy, D.* and *Csordás, J.:* Orvosi Hetilap **26**, 329 (1951).

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ СО СТЕРАНОВОЙ СТРУКТУРОЙ НА НЕРВНУЮ И МЫШЕЧНУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

I. Действие *in vitro* на поперечнополосатую мускулатуру лягушек

Е. Эндрэци и А. Тидьи

Физиологический институт медицинского университета, г. Печ

Резюме

Авторами исследовано влияние кортикоидных, лутеоидных, фолликулоидных и тестоидных гормонов и производных гормонов в условиях in vitro на ацетилхолиновую контрактуру прямого мышца живота. Лутеоидные, тестоидные и кортикоидные стероиды проявляют угнетающее, а фолликулоиды возбуждающее действие. Холевая кислота и ее производные, также как и холестерин оказались недействительными. Низкая концентрация и групповая специфичность указывают на физиологическое влияние

THE THERMOREGULATORY SIGNIFICANCE OF THE INCREASE IN O_2-CONSUMPTION ELICITED BY HIGH ENVIRONMENTAL TEMPERATURE

By

SZ. DONHOFFER, GY. MESTYÁN, E. OBRINCSÁK, T. PAP and I. TÓTH

INSTITUTE OF PATHOPHYSIOLOGY OF THE MEDICAL UNIVERSITY, PÉCS

(Received, 14th October 1952)

The increase in O_2-consumption observed in the course of hyperthermia following exposure to high environmental termperatures (1) is generally attributed to the operation of *van't Hoff's* rule, i. e. it is considered to be a direct consequence of the elevation of body temperature. The metabolic response of thyroidectomized, hypophysectomized and thiouracil treated rats to high temperatures proved this assumption to be untenable, for no rise of O_2-consumption occurred when body temperature rose above the level which in the normal rat is invariably associated with a marked increase in the metabolic rate (2—4.)

Another explanation, proposed by some as an alternative to *van't Hoff's* rule, suggests that the rise of O_2-consumption in the hyperthermic animal is due to the increased O_2-demand of mechanisms concerned with heat loss (increase of minute volume, tachypnoe, etc.), and therefore constitutes — although indirectly — an essential phenomenon of thermoregulation in hyperthermia. The observation that the metabolic response to hyperthermia is abolished by urethane, chloralhydrate and certain cerebral lesions, furnished irrefutable proof of the central nervous mediation of this response (5). The central nervous origin seems to support, or is at least consistent with, the explanation given as an alternative to *van't Hoff's* rule, but cannot be considered to furnish conclusive evidence of its validity. Therefore, a detailed analysis of the data obtained in the course of these studies seemed desirable.

Methods

The same methods were employed as in earlier work (2—6). Three 15 min. determinations of O_2-consumption were made at each temperature, and body temperature was measured rectally at the end of these. It must be noted, that the gas chamber of the apparatus was fairly saturated with water vapour, and therefore lower temperatures sufficed for raising body temperature to the same level, than are necessary for instance in a well aired thermosthate. Experiments on thyroidectomized, hypophyseetomized and methylthiouracil (1 g per kg food) treated rats, recorded in this work, were performed a few weeks, or some months, after operation or after commencing methylthiouracil treatment.

Results

The problem, whether the rise of O_2-consumption in hyperthermia is due to the increased O_2-demand of mechanisms concerned with heat loss, and

whether it is therefore a manifestation of thermoregulatory processes in the strict sense, seems at first rather easily amenable to solution. If the rise of O_2-consumption is due to the increased O_2-demand of mechanisms serving heat dissipation, and is thus a direct consequence of their increased activity, it could be expected that the hyperthermia would be of a lesser degree if O_2-consumption increases, than in the absence of a rise, for the latter would indicate that the mechanisms of heat loss failed to increase their activity. On the other hand, if the increase in O_2-consumption is not concerned with the increased activity of mechanisms operating heat loss, a higher rise of body temperature could be expected than the one observed at the same environmental temperature without a rise of the metabolic rate, i. e. without an increase in heat production.

TABLE I

Body temperature of rats after exposure for 1,5 hours to different environmental temperatures.

$$\left[M \pm \sqrt{\frac{\Sigma \Delta x^2}{n(n-1)}} \right]$$

	Temperature of environment 29° C	Temperature of environment 35° C	Difference	Temperature of environment 37° C	Difference	Temperature of environment 38° C	Difference
Normal	37,0±0,1 n=36	38,6±0,1 n=32	1,6°	39,4±0,1 n=13	2,4°	—	—
Thyroidectomized	36,0±0,1 n=48	38,0±0,1 n=48	2,0°	38,6±0,1 n=23	2,6°	40,0±0,1 n=19	4,0°
Hypophysectomized	35,9±0,1 n=28	37,5±0,1 n=25	1,6°	39,5±0,1 n=15	3,6°	40,0 n=4	
Thiouracil-treated.....	35,6±0,1 n=64	37,8±0,1 n=30	2,2°	39,0±0,1 n=49	3,4°	40,0±0,1 n=46	4,4°

It is evident from Table I that the body temperature of thyroidectomized, hypophysectomized and thiouracil treated rats is markedly lower in an environment of 35° C, than in normal animals at the same ambient temperature, while at 37° C the difference is less marked, or in hypophysectomized rats even disappears.

The fact that the elevation of body temperature of thyroidectomized, hypophysectomized and thiouracil treated rats is greater than, or at least equal to, the one observed in normal animals, in spite of O_2-consumption being approximately half that of a normal rat at the same temperature (*Fig.* 1), seems to suggest that the rise of the metabolic rate in hyperthermia might be in some way concerned with heat loss, and might therefore be a manifestation of a thermoregulatory process.

On the other hand, the observation that the body temperature of thyroidectomized, hypophysectomized and thiouracil treated rats does not

exceed the level observed in normal animals at the same ambient temperature, renders this circumstantial evidence rather inconclusive.

Comparison of the body temperature of normal rats, untreated, and under the effect of small doses of urethane and chloralhydrate (5), seemed to offer a more promising approach, for, in an environment of indifferent temperature O_2-consumption is either not affected by these drugs, or the difference is at least considerably smaller, than the one between the metabolic rate of

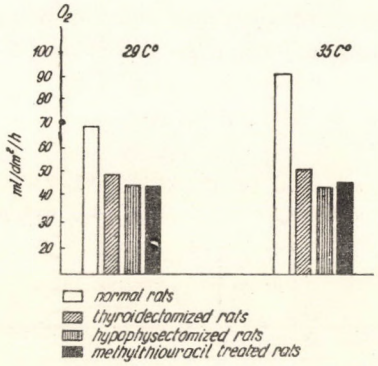


Fig. 1. O_2-consumption of normal, thyroidectomized, hypophysectomized and methylthiouracil treated rats in an environment of 29° and 35°C

normal rats on the one hand, and of thyroidectomized, hypophysectomized and thiouracil treated rats, on the other.

TABLE II

(n=17)

Body temperature and O_2-consumption at 29° C and 35° C before and after administration of 0,08 to 0,09 g urethane per 100 g body weight.

$$\left[M \pm \sqrt{\frac{\Sigma \Delta x^2}{n(n-1)}}\right]$$

	Before urethane			After urethane		
	29°	35°	Difference	29°	35°	Difference
Body temperature	37,2±0,12	39,2±0,1	+2,0°	36,5±0,14	38,8±0,14	+2,3°
O_2-consumption ml/dm²/h	65±1	84±1,5	+19	69±2	67±2	—2

Table II shows that in the course of exposure to an environment of 35° C, body temperature rose before urethane by 2,0° C, while under the effect of urethane an average rise of 2,3° C was observed, in spite of the fact that O_2-consumption increased by 29 per cent in the former case and remained

unchanged in the latter. This again could be construed to indicate that the increased metabolic rate is of a thermoregulatory significance. On the other hand, body temperature being higher before, than after urethane, it could be argued that an increased O_2-consumption being associated with higher body temperature cannot be considered to be due to an increased activity and a consecutively increased O_2-demand of the mechanism of heat loss. Considering, however, that under the effect of urethane body temperature was lower than in the untreated animal both at 29° C and and after exposure to high temperatures, both ways of reasoning are anything but convincing. Essentially the same applies to the results obtained with chloralhydrate (Table III).

TABLE III

(n=11)

Body temperature and O_2-consumption at 29° C and 36° C before and after the administration of 0,02 g chloralhydrate per 100 g body weight.

$$\left[M \pm \sqrt{\frac{\Sigma \Delta x^2}{n(n-1)}}\right]$$

	Before chloralhydrate			After chloralhydrate		
	29°	36°	Difference	29°	36°	Difference
Body temperature	37,0±0,14	40,2±0,1	3,2°	36,2±0,25	39,5±0,19	3,3°
O_2-consumption ml/dm²/h	68±2	84±3	+16	59±2	59±3	±0

A direct approach to the problem was opened by the observation that administration of small doses of thyroxine restores in the thyroidectomized, hypophysectomized and thiouracil treated rat the response of the metabolic rate to hyperthermia (2,7). In the autumn, usually a single subcutaneous injection of 3 to 10 μg of thyroxine sufficed to restore within two hours the response of O_2-consumption to high environmental temperature ; in the other seasons this response could be elicited often only on the following day or, especially in summer, even several doses of the same order of magnitude were needed for the same purpose.

These observations permit to compare body temperature reached at the same high environmental temperature in the absence, and after restoration, of the metabolic response in the same animal, body temperature and O_2-consumption in an environment of indifferent temperature being equal in both tests.

Table IV records some experiments of this kind, in which a marked metabolic response was obtained by exposure to heat in the course of the second hour after administration of a single dose of thyroxine, while just before

TABLE IV*

No.	Rat	Date of experiment	Dose of thyroxine µg	High ambient temperature C°	Body temperature at 29° C			Body temperature after exposure to high temperature			O_2-consumption in ml/dm²/h**				
											before thyroxine		after thyroxine		
					before thyroxine	after thyroxine	Difference	before thyroxine	after thyroxine	Difference	at 29° C	during exposure to high temperature	at 29° C	during exposure to high temperature	increase at high temperature
1.	21. HE. ♂	25. X. 1951.	5	35,0	36,2	36,0	—0,2	38,0	38,0	±0	45	45	45	57	24%
2.	25. HE. ♂	17. XI. 1951.	3	34,8	35,4	35,6	+0,2	37,9	37,8	—0,1	39	39	39	52	33%
3.	25. HE. ♂	29. XI. 1951.	3	37,0	34,6	34,5	—0,1	38,4	38,2	—0,2	33	32	32	40	25%
4.	366. TE. ♂	26. X. 1951.	5	36,5	36,0	36,0	±0	38,8	38,8	±0	51	53	50	64	28%
5.	366. TE. ♂	12. XI. 1951.	5	36,5	36,0	36,0	±0	38,8	38,5	—0,3	66	66	65	81	20%
6.	374. TE. ♂	17. XI. 1951.	5	35,0	36,2	36,0	—0,2	39,0	39,0	±0	48	49	47	68	45%
7.	374. TE. ♂	19. XI. 1951.	5	35,0	36,0	36,0	±0	38,2	38,2	±0	46	44	45	54	20%
8.	O., TU. ♂	30. X. 1951.	10	36,4	35,5	35,6	+0,1	38,8	38,6	—0,2	50	49	51	61	20%
9.	N., TU. ♂	26. XI. 1951.	10	36,0	35,6	35,6	±0	39,3	39,4	+0,1	40	40	41	58	41%
10.	N., TU. ♂	24. XI. 1951.	10	36,0	35,2	35,3	+0,1	39,4	39,4	±0	37	39	38	53	40%

TE = thyroidectomized; HE = hypophysectomized; TU = methylthiouracil treated.

* Immediate responses of O_2-consumption to similar doses of thyroxine were infrequent during the period of these experiments, and are not included in this table. In all observations recorded here, O_2-consumption returned after exposure to high temperature, at indifferent temperature to the level observed before.

** Mean of three closely agreeing determinations.

TABLE V

TE=thyroidectomized; TU=methylthiouracil treated.

No.	Rat	Date of enperiments	Body temperature and O_2-consumption during exposure to 36° C before thyroxine				Response of O_2-consumption to exposure to heat restored by thyroxine				Difference of body temperature in an environment of 36° C in the absence and presence of increased O_2-consumption
			Body temperature in an exvironment of		O_2-consumption* in an environment of		Body temperature in an environment of		O_2-consumption* in an environment of		
			29°	36°	29°	36°	29°	36°	29°	36°	
1.	344. TE. ♂	9. and 10. IV. 1952.	35,2	39,5	48	49	35,0	39,7	45	56	+0,2°
2.	344. TE. ♂	11. and 12. IV. 1952.	35,0	39,0	42	43	35,0	39,2	43	51	+0,2°
3.	O., TU. ♂	29. and 30. XI. 1951.	36,1	39,1	44	44	35,9	39,1	42	62	±0,0°
4.	901. TU. ♂	7. and 8. III. 1952.	36,0	38,9	42	43	36,2	38,8	42	52	—0,1°
5.	901. TU. ♂	6. and 7. IV. 1952.	36,1	39,1	42	43	36,2	39,3	39	54	+0,2°
6.	902. TU. ♂	1. and 11. IV. 1952.	35,7	38,6	29	29	35,2	38,9	29	42	+0,3°
7.	902. TU. ♂	25. and 29. IV. 1952.	36,1	38,8	33	30	36,0	38,7	32	40	—0,1°
8.	905. TU. ♂	5. and 7. V. 1952.	36,0	38,2	46	42	36,3	38,7	48	57	+0,5°
9.	909. TU. ♂	14. and 23. VII. 1952.	36,4	39,6	43	43	36,5	39,8	41	53	+0,2°
10.	911. TU. ♂	21. and 22. VII. fi952.	36,5	39,5	57	56	36,9	40,5	60	74	+1,0°

* ml $O_2/dm^2/h$; mean of three closely agreeing determinations.

the injection of thyroxine exposure to the same environment failed to elicit a rise in O_2-consumption.

It is evident that although heat production is increased by exposure to heat by 20 to 45 per cent after administration of thyroxine, body temperature is practically the same as in the preceding observation at the same environmental temperature in the absence of a rise in O_2-consumption. The differences observed do not exceed those recorded in the same animal exposed to the same environment in consecutive tests without any change of heat production.

In Table V observations are recorded in wich at least 24 hours elapsed since the last injection of thyroxine. Tests performed on consecutive days indicate that a single injection of 5 to 10 μg thyroxine had been given ; a longer interval between the tests shows that similar doses have been administered for two or more days. Differences of body temperature in the course of exposure to heat is in most cases of the same order as in the acute experiments recorded in Table IV.

These observations furnish therefore no data which could be interpreted in favour of the thermoregulatory significance of increased O_2-consumption in hyperthermia. Statistical evaluation of all 38 experiments in which the metabolic response to hyperthermia was restored by thyroxine gives even more convincing results.

TABLE VI

(n=38)

Body temperature and O_2-consumption of thyroidectomized, hypophysectomized and methylthiouracil treated rats in the absence of a rise of O_2-consumption during exposure to high temperature and after restoration of the rise by thyroxine.

$$\left[M \pm \sqrt{\frac{\Sigma \Delta x^2}{n(n-1)}}\right]$$

	Indifferent temperature (29°C)		High temperature (35—37°C)	
	Before thyroxine	After thyroxine	Before thyroxine	After thyroxine
O_2-consumption cc/dm²/h	45±1	45±1	44±1	58±1
Body temperature	35,9±0,11	35,9±0,11	38,8±0,08	38,8±0,08

Table VI shows that while O_2-consumption, i. e. heat production, rises by approximately 30 per cent in the course of exposure to heat after thyroxine, body temperature rises exactly to the same level as the one reached at the same environmental temperature before administration of thyroxine without a rise in heat production.

Discussion

Body temperature not being affected in the course of exposure to heat by the presence, or absence, of increased O_2-consumption, the view that the rise is due to the increased activity and the consecutively increased O_2-demand of mechanisms operating heat dissipation, seems untenable, for then a smaller rise of body temperature could be expected in the presence of the metabolic response, than in its absence, which is evidently not the case. Heat dissipation is nevertheless augmented, for body temperature does not rise to higher levels than in the absence of an increase in O_2-consumption; heat loss, however, increases only to the extent sufficient for dissipating extra heat produced and no more. The rise of the metabolic rate in hyperthermia not being simply a consequence of the increased activity of the mechanism of heat loss, it must be concluded that the central nervous mechanism responsible for the increase of the metabolic rate in hyperthermia ist not an essential factor in the thermoregulatory process.

On the other hand, the fact that although O_2-consumption may be augmented by 30 per cent or more during exposure to heat, body temperature remains the same as in the absence of increased heat production, discloses that »passive« hyperthermia is after all not quite so passive as the term seems to suggest. Storage of the heat produced by a 14 ml per dm^2 per hour increase of O_2-consumption would raise the body temperature within 1,5 hours by 2.0° C, in some cases (Table IV. No. 6., Table V. No. 3.) even a rise of 3.0° C could be expected. It is therefore evident that no appreciable storage of heat takes place. In other words, hyperthermia ensuing exposure to high temperatures is, within certain limits, not due to passive heat storage (»Wärmestauung«), but body temperature is being maintained at a higher level by regulatory mechanisms, which permit the maintenance of this higher level in spite of considerable changes in heat production.

Summary

The analysis of body temperature and O_2-consumption of normal, thyroidectomized, hypophysectomized and methylthiouracil treated rats shows, that (i) increased O_2-consumption in hyperthermia ensuing exposure to heat is not a manifestation of *van't Hoff's* rule, (ii) there is no evidence supporting the assumption that the increased O_2-consumption in the normal hyperthermic animal is due to an increased activity and consecutively an increased O_2-demand of the mechanisms operating heat loss, and (iii) passive hyperthermia is, within certain limits, not really passive, but represents regulation at a higher level, which can be maintained in spite of varying heat production.

LITERATURE

1. *Rubner, M.:* Die Gesetze des Energieverbrauchs bei der Ernährung. F. Deuticke, Leipzig und Wien, p. 133. (1902).
2. *Balogh, L., Donhoffer, Sz., Mestyán, Gy., Pap, T.* and *Tóth, I.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 395 (1952).
3. *Balogh, L., Donhoffer, Sz., Mestyán, Gy., Pap, T.* and *Tóth, I.:* Endokrinologie, **29**, 190 (1952).
4. *Donhoffer, Sz., Mestyán, Gy.* and *Pap, T.:* Nature **169**, 972 (1952).
5. *Donhoffer, Sz., Mestyán, Gy., Obrincsák, E., Pap, T.* and *Tóth, I.:* Acta Physiol. Hung. **4**, 63 (1953).
6. *Balogh, L., Donhoffer, Sz., Mestyán, Gy., Pap, T.* and *Tóth, I.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 367 (1952).
7. *Donhoffer, Sz., Mestyán, Gy., Obrincsák, E., Pap, T.* and *Tóth, I.:* Kísérletes Orvostudomány **4**, 405 (1952).

РОЛЬ ПОВЫШЕНИЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ O_2, ВОЗНИКАЮЩЕГО ПРИ ВЫСОКОЙ ВНЕШНЕЙ ТЕМПЕРАТУРЕ, НА ТЕПЛОРЕГУЛЯЦИЮ

С. Донгоффер, Д. Мештян, Е. Обринчак, Т. Пап и И. Тот

Патологический институт медицинского университета, г. Печ.

Р е з ю м е

У крыс над которым было проведено экстирпация щитовидной железы и гипофиза, и у крыс леченных метилтиоурацилом, также как и у крыс находящихся под влиянием уретана и хлоралгидрата и после известных нарушений головного мозга, при гипертермии, вызванной высокой внешней температурой, потребление O_2 не повышается. Этот факт исключает возможность объяснения этого явления, всегда возникающего у нормальных крыс, законом ван'т Гоффа.

При одинаковой внешней температуре, у крыс над которым была проведена экстирпация щитовидной железы и гипофиза, и у крыс, леченных тиоурацилом, температура тела повышается без повышения потребления O_2 до уровня, который достигается после дозировки тироксина, и который восстанавливает повышение расхода O_2, возникающее при высокой внешней температуре. Это наблюдение противоречит предположению, согласно которому повышение потребления O_2 обусловлено повышенной потребностью в O_2 механизмов, служащих для теплоотдачи.

Кроме того, этим наблюдением подтверждается то, что в гипертермии, вызванной высокой внешней температурой, — по крайней мере в известных пределах, — речь идет не о простом застое температуры, а о регулировании температуры тела на более высоком уровне, которое животное может содержать при меняющемся потреблений O_2, т. е. при переменной теплопродукции.

BEITRÄGE ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DES AZULENOLS

Von

ZS. GÁSPÁR-NÉMETH und B. ISSEKUTZ jun.

PHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, SZEGED

(Eingegangen: am 8. Januar 1953)

Aus den Untersuchungen von *Jancsó* (1) ist bekannt, dass durch subkutane Injektionen des aus der Matricaria chamomilla und Achillea millefolium mit Wasserdampfdestillation gewonnenen azulenhaltigen Öles in den Geweben eine Histaminfreisetzung erreicht werden kann. Jancsó stellte fest, dass das Hamazulen ähnlich wie das Histamin das Gefässendothel zur Phagocytose anregt. Diese Wirkung kann bei Mäusen durch Histamindesensibilisierung bzw. durch Antihistaminverabreichung aufgehoben werden.

Diese Untersuchungen waren Ausgangspunkt zahlreicher Versuche zur therapeutischen Anwendung des Azulenols. Es wurde vorgeschlagen, nicht nur die histaminfreimachende, das Retikuloendothel aktivierende Wirkung dieses Mittels auszunützen, sondern durch wiederholte intramuskuläre Einspritzung desselben im Organismus eine allmähliche Histaminfreisetzung auslösend — eine endogene Histamindesensibilisierung anzustreben. Von diesen Überlegungen ausgehend, versuchte *Blazsó* (2) das Azulenol beim Asthma und anderen allergischen Erkrankungen des Kindesalters wie z. B. bei Urticaria, Collitis usw. anzuwenden, und auch *Vargha* (3) führte in die Therapie der Histamin-Migräne der Erwachsenen wiederholte Azulenolinjektionen ein. Beide Autoren berichten über sehr günstige Ergebnisse, so dass es angebracht erschien, zu prüfen, ob diese histamindesensibilisierende Wirkung der chronischen Azulenolbehandlung auch in Tierversuchen nachweisbar ist.

Methodik

In unseren Versuchen wurde an 120—150 g schweren Albinoratten beiderlei Geschlechts das von *Selye* (4), sowie *Leger* und *Masson* (5) beschriebene Eiereiweissödem hervorgerufen. Eine Stunde nach intraperitonealer Injektion von 1 ml Eiereiweiss zeigten sich — begleitet von starkem Hautjucken — Schwellungen und Ödem der Extremitäten und der Nase, da die Ratte eine spontane Hypersensibilität für das Ovomucoid besitzt. Innerhalb von 2—3 Stunden verschwinden diese Symptome. Nach den Untersuchungen von *Halpern* (6) können diese Erscheinungen mit Antihistaminen verhindert werden. Wir wählten für unsere Untersuchungen diesen Test, nachdem dieser in mehrfacher Hinsicht an die Urticaria des Menschen erinnert und sehr gut reproduzierbar ist.

Die Vorbehandlung dauerte im allgemeinen 2—4 Wochen. Während dieser Zeit wurde den Tieren jeden 2. Tag 0,0,2 ml Azulenol mit 2%-igem bzw. 33%-igem Azulengehalt verab-

reicht, und darauf wurde die Eiereiweissreaktition ausgelöst. Jede Gruppe bestand aus 10—20 Tieren. Zur Kontrolle dienten die bei den unbehandelten bzw, mit Ol. helianthi behandelten Ratten des gleichen Stammes erhaltenen Reaktionen.

Das Ausmass des Ödems wurde durch Bestimmungen des Durchmessers der Füsse vor und 1 bzw. 2 Stunden nach der Eiweissverabreichung bestimmt, wobei sorgfältigst darauf geachtet wurde, dass die Messungen stets an der gleichen Stelle vorgenommen und die ödematösen weichen Gewebe mit den Flügeln der Schieblehre nicht zusammengedrückt werden. Die Genauigkeit der Messungen war gleich 0,1 mm. Da die Ödeme nicht überall gleich stark auftraten, mussten alle vier Füsse gesondert gemessen werden. Die Zunahme wurde in Prozenten der vor der Eiweissverabfolgung erhaltenen normalen Werte ausgedrückt und die Ergebnisse der behandelten, wie auch der Kontrollgruppen statistisch aufgearbeitet.

Ergebnisse

In zahlreichen Vorversuchen zeigte sich, dass das Azulenol keine Antihistaminwirkung besitzt. ½ bzw. 1 Stunde vor der Eiweissverabreichung zugeführten verschiedenen Mengen Azulenol beeinflussten die Entwicklung des Ödems überhaupt nicht.

Nachdem diese Frage geklärt wurde, nahmen wir bei der ersten Tiergruppe eine zweiwöchige Dauervorbehandlung mit 0,05 ml von einer 2%-igen Azulenollösung vor. 24 Stunden nach der beendeten Behandlung wurde das Ödem ausgelöst. Hier unterschied sich die Ödembildung der behandelten Tiere nicht von der der Kontrollen. In der behandelten Gruppe nahm der Umfang des Fusses in der ersten Stunde im Mittelwert um 53 $\pm$ 8,98% und in der unbehandelten um 66 $\pm$ 4,91% zu (Azulenol : Kontrolle $t = 0{,}82643$, $P = 0{,}30$) und in der zweiten Stunde um 76 $\pm$ 3,09 bzw. um 69 $\pm$ 2,76% zu (A. : $K. = t = 0{,}12978$, $P < 0{,}80$), was aber keinen signifikanten Unterschied bedeutet.

Diese Gruppe wurde weiter behandelt, jetzt aber schon mit sehr hohen Azulenoldosen, d. h. 4 Wochen hindurch mit 0,2 ml einer 33%-igen Lösung. Die jetzt vorgenommene Probe ergab die Zunahme des Durchmessers der Füsse der behandelten Tiere gegenüber denen der Kontrollen von 72 $\pm$ 5,02% in der ersten Stunde nur 26 $\pm$ 4,28% und in der zweiten Stunde 54 $\pm$ 2,30%, bzw. 32 $\pm$ 3,04% ausmachten (s. *Abb. 1*). Bei einem Teil dieser Tiere traten überhaupt keine, bei einem anderen Teil nur wesentlich mindere Symptome in Erscheinung.

An weiteren Versuchsgruppen wurde dann untersucht, wie lange der Schutz nach der schon eingestellten Behandlung noch anhält. 40 Ratten erhielten zwei Wochen hindurch je 0,2 ml 33%-igen Azulenol — ähnlich wie oben — und das Ausmass des Ödems wurde in der gleichen Weise gemessen wie zuvor (Abb. 2). Hier zeigten die behandelten Ratten bei den unmittelbar nach beendeter Behandlung vorgenommenen Bestimmungen in der ersten Stunde nach der Eiweissverabreichung — gegenüber der 33 $\pm$ 5,70%-igen Schwellung der Kontrollen — durchschnittlich eine nur 7,5 $\pm$ 1,82%-ige ödematöse Durchmesserzunahme (A. : K. $t = 2{,}4966$, $P < 0{,}02$) und in der zweiten Stunde 60 $\pm$ 5,30%, bzw. 27 $\pm$ 4,10% (A. : K. $t = 3{,}4641$, $P < 0{,}01$). 20 Tage später betrugen die

Abweichungen bei den vorbehandelten Tieren in der ersten Stunde im Mittelwert 4,5 ± 1,12% (A) während bei unbehandelten Tieren 46± 5,86% (A. : K. $t =$

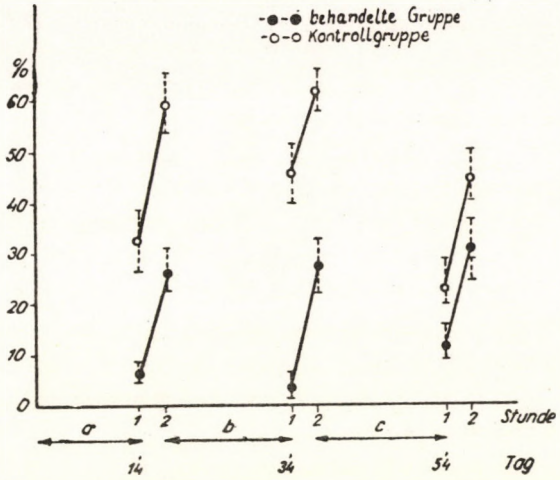


Abb. 1. Ordinate : ödematöse Schwellung in Prozenten des Normalen ausgedrückt. Abszisse : Dauer der Behandlung, bzw. 1 u. 2 stündige Messungen. *a)* 0,05 ml 2%-iges Azulenol zweitäglich, *b)* 0,2 ml 33%-iges Azulenol zweitäglich

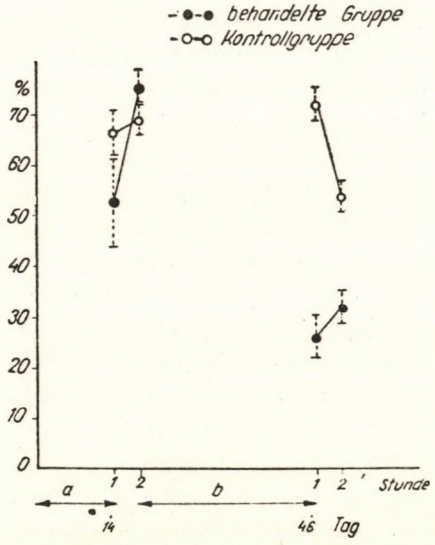


Abb. 2. Ordinate und Abszisse wie in Tab. 1. *a)* 0,2 ml 33%-iges Azulenol. *b)* 20 Tage ohne Behandlung. *c)* 20 weitere Tage ohne Behandlung

$= 4{,}7000$, $P < 0{,}01$) und in der zweiten Stunde waren die entsprechenden Werte 28± 4,40% (A), bzw. 63± 3,95% (K) (A. : K. $t = 4{,}197$, $P < 0{,}01$). Es zeigte sich also auch in dieser Versuchsserie ein signifikanter Unterschied zwischen behandelten Gruppen und Kontrollgruppen.

Nach einer Ruhepause von weiteren 20 Tagen betrug das Ergebnis in der ersten Stunde $13 \pm 2{,}21\%$ (A), bzw. $24 \pm 3{,}25\%$ (K) (A. : K. $t = 1{,}6785$, $P \sim 0{,}1$) und in der zweiten Stunde $32 \pm 6{,}66\%$ (A) bzw. $46 \pm 4{,}10\%$ (K), welche Differenz schon nicht mehr ausgesprochen signifikant zu nennen ist. Allerdings war bei diesen Bestimmungen das Ödem auch in der Kontrollgruppe nicht so stark entwickelt wie zu Versuchsbeginn.

Bei den azulenolbehandelten Tieren war an der Injektionsstelle noch 40 Tage nach Einstellen der Behandlung stets ein durch faseriges Bindgewebe von der Umgebung abgegrenztes Infiltrat zu beobachten, in dessen Mittelpunkt — bis zur restlosen Resorption — das blaufarbene Azulenol nachweisbar war. Bei den mit Ol. helianthi behandelten Tieren wurden ähnliche histologische Veränderungen in keinem Falle beobachtet. Hier wurde das injizierte Öl binnen 2—3 Tagen volkommen resorbiert.

In dieser Untersuchungsserie konnte auch beobachtet werden, dass die Tiere meistens nur solange eine verminderte Reaktion zeigten bis die Depots fühlbar waren.

Es wurden auch Versuche an Meerschweinchen angestellt, in denen die Beeinflussbarkeit des mit Histamin-Aerosol auslösbaren Bronchuskrampfes geprüft wurde. Diese Versuche führten nicht zu derart einheitlichen Ergebnissen wie die Bestimmungen an Ratten. In manchen Tiergruppen wurden nach der Behandlung auffallende zeitliche Verschiebungen oder völliges Ausbleiben des Bronchusspasmus beobachtet, ein Geschehen das in anderen Gruppen nicht vorkam.

Besprechung

Das bei Ratten nach Injektion rohen Eiereiweisses in Erscheinung tretende, an die Urticaria des Menschen erinnernde Ödem kann mit Antihistaminen günstig beeinflusst werden (6). Dies scheint darauf hinzuweisen, dass in der Entstehung des Ovomucoidödems histaminartige Stoffe eine Rolle spielen. *Schachter* und *Talesnik* (7) haben nachgewiesen, dass das i. v verabreichte Eiereiweiss den Histamingehalt des Rattenplasmas erhöht und gleichzeitig eine Hämokonzentration hervorruft. Das auf die Wirkung von Ovomucoid auftretende Ödem ist auf Histaminfreisetzung zurückzuführen. In eigenen Untersuchungen hemmte zwar die chronische Azulenolvorbehandlung die Entstehung solcher Ödeme, doch entfaltete das Azulenol selbst in akuten Versuchen keine unmittelbare Schutzwirkung und kann so keinesfalls den Antihistaminen zugerechnet werden.

Aus den Untersuchungen *Jancsó's (1)* ist es bekannt, dass das injizierte Azulenol in den Geweben Histamin freimacht und somit ist die einfachste Erklärung bei der Bewertung unserer Versuchsergebnisse, dass das Azulenol eine endogene Histamindesensibilisierung bewirkt.

Die an Meerschweinchen vorgenommenen Untersuchungen bestätigten diese Hypothese zwar nicht in jedem Falle, doch spricht dies nicht unbedingt gegen die Theorie einer endogenen Histamindesensibilisierung, da gerade die Histamindesensibilisierbarkeit des Meerschweinchens ein umstrittenes Problem ist. Zahlreiche Autoren haben eine gewisse Adaptation an Histamin nachgewiesen, während andere, wie z. B. Jancsó (1), bei Meerschweinchen keine, bei Ratten und Mäusen aber eine sehr hochgradige Angewöhnung erreichten.

Dass bei Ratten nur nach relativ grossen Azulenoldosen eine Schutzwirkung entwickelt wurde, dürfte darauf zurückgeführt werden, dass diese Tiere eine sehr hohe Histamintoleranz besitzen.

Zusammenfassung

Bei Ratten bleibt das von Eiereiweiss hervorgerufene Ödem nach chronischer Azulenolvorbehandlung entweder aus oder aber kommt es nur in wesentlich milderer Form zum Ausdruck, welche Erscheinung einer endogenen Histamindesensibilisierung zuzuschreiben ist. Durch akut verabreichtes Azulenol wird die Ödembildung nicht beeinflusst.

LITERATUR

1. *Jancsó, M.:* Orvosok Lapja **3**, 1025 (1947).
2. *Blazsó, S.:* Schweizerische Med. Wschrft. **79**, 222 (1949).
3. *Vargha, M.:* Orvosi Hetilap **91**, 45 (1950).
4. *Selye, H.:* Endocrinology **12**, 169 (1937).
5. *Leger, j. Masson, M.:* Proc. Soc. exp. Biol. Med. **64**, 366 (1947).
6. *Halpern, B. N.:* La Presse Medical **65**, 949 (1949).
7. *Schachter, M.* u. *Talesnik, J.:* J. Physiol. **118**, 258 (1952).

О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ АЗУЛЕНОЛА

Ж. Гашпар-Немет и Б. Ишшекуц

Физиологический институт медицинского университета, г. Сегед

Резюме

У крыс, предварительно леченных длительно Азуленолом, вызванный яичным белком отек совсем отсутствует или же проявляется в смягченной форме. Это явление обуславливается эндогенной десенсибилизацией гистамина. В остром опыте Азуленол не повлияет на образование отека.

AUSBILDUNG DES BEDINGTEN REFLEXES IN VERBINDUNG MIT DER FUNKTION DER NEBENNIERENRINDE

Von

P. WEISZ, E. GLÁZ, P. KERTAI, K. WEISZ, SZ. VASENSZKY und T. GÁTI

PATHOPHYSIOLOGISCHES INSTITUT UND III. MEDIZINISCHE KLINIK DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT. BUDAPEST

(Eingegangen: am 10. Januar 1953)

Nach der »Stress«-Theorie von *Selye* reagiert der Organismus auf die ihm zugefügten verschiedenen Noxen (Toxine, Kälte, Wärme, Diätfehler, sog. »emotionelle Einflüsse« usw.) mit der Mobilisation des Hypophyse-Nebennierenrinde-Systems. Diese rein humorale Erklärung wurde später modifiziert und heute wird bereits allgemein die Rolle der subkortikalen Zentren anerkannt. Die höhere Nerventätigkeit, die Rolle des Kortex, blieb aber auch weiterhin ungeklärt.

»Es kann unschwer wahrgenommen werden«, schrieb *Pawlow* (1), »dass die Reaktionen des Körpers unter normalen Umständen nicht nur durch die für den Organismus wesentlichen Wirkungskräfte der Aussenwelt ausgelöst werden, d. h. durch Wirkungskräfte, die für den Organismus unmittelbar vorteilhaft oder schädlich sind, sondern dass diese Reaktionen auch durch unzählige andere Wirkungen hervorgerufen werden können, durch Wirkungen, die lediglich die Zeichengeber der obigen wesentlichen Wirkungskräfte sind.« Diese Zeichen stellen also die bedingten Reize der bedingten Abwehrreflexe dar, so dass aller Grund zur Annahme bestand, dass in Beziehung zum Hypophyse-Nebennierenrinde-System, das eines der Abwehrsysteme des Organismus ist, gleichfalls bedingte Reflexe ausgebildet werden bzw. ausgebildet werden können.

In der Literatur wurden zwar diesbezüglich einige Angaben gefunden, doch bezogen sie sich zum überwiegenden Teil auf die Analysatorfunktion der Gehirnrinde. So war es bekannt, dass starke Schall- und Lichtreize die Tätigkeit des Hypophyse-Nebennierenrinde-Systems steigern (2). Bekannt war ferner die gesteigerte Funktion des Systems im Falle von Beklemmung (3), sowie auch bei anderen sog. »emotionellen Reizen« [Verabreichung s. c. einer hypertonischen Kochsalzlösung (4), Immobilisierung von Tieren durch Fesselung (5)]. Diese Literaturangaben besagen aber nichts anderes, als dass das Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinde-System unter anderem auch durch Reize mobilisiert wird, die von den Analysatoren der Gehirnrinde kommen. Dagegen weisen sie nicht auf die zentrale Rolle der Gehirnrinde bei der Lenkung der Antwort auf sämtliche Umweltseinflüsse hin.

Lissák, *Endrőczi* und Mitarbeiter berichten in mehreren Mitteilungen, dass die Reizung der Gehirnrinde die Funktion des Hypophyse-Nebennierenrinde-Systems steigert (6, 7, 8, 9) bzw. dass diese durch Unterbrechung der Verbindung zwischen der frontalen Rinde und den subkortikalen Zentren wesentlich beeinflusst wird.

In den hier beschriebenen Versuchen wurde angestrebt, die Rolle der Gehirnrinde durch die Ausbildung eines bedingten Reflexes klarzustellen. Bei den Überlegungen über die Lösung dieses Problems wurde ausser auf die Werke *Pawlows* auch auf die Angaben von *Bykow* Bedacht genommen (10), der nachgewiesen hat, dass in Verbindung mit der Tätigkeit nahezu jedes inneren Organs ein bedingter Reflex ausgebildet werden kann.

Methoden und Ergebnisse

Als Charakteristik für die Nebennierenrinden-Funktion wurde in den vorliegenden Untersuchungen der Askorbinsäuregehalt der Nebenniere mit der Methode von *Roe-Kuether* (11) bzw. mit deren *Geschwind*schen Modifikation (12) bestimmt. Von den zahlreichen die Tätigkeit der Nebennierenrinde charakterisierenden Verfahren schien nämlich nach Durchsicht der Literatur dieses am verlässlichsten zu sein.

Zuerst wurde ein bedingter Reflex in Verbindung mit der Askorbinsäureverminderung der Nebenniere ausgebildet, wobei diese Verminderung durch Adrenalin hervorgerufen wurde. Das Adrenalin wurde aus zwei Gründen gewählt. Einerseits, weil das Adrenalin eine, wenn auch nicht ausschliessliche, so doch bedeutende Rolle bei der das Hypophyse-Nebennierenrinde-System aktivierenden Wirkung der verschiedenen Einflüsse, »Stresse« zu spielen scheint, und andererseits, weil es nach den Literaturangaben gelungen war, zahlreiche Wirkungen des Adrenalins, wie z. B. Milzkontraktion (10), Pupillen- (13) und Kreislaufwirkung (10) zu konditionieren.

Zu den Versuchen wurden weisse Ratten verwendet. Die Tiere wurden zur besseren Schallisolation in doppelwändigen Kisten, in voneinander isolierten Käfigen gehalten. Die Kisten befanden sich in einem Raume, der für keine anderen Zwecke benutzt wurde. Die Tiere wurden während 20 Tage täglich zu demselben Zeitpunkt konditioniert. Dies bestand aus Läuten mit einer elektrischen Glocke und der subkutanen Einspritzung von 0,04 mg/100 g Adrenalin. Es wurde darauf geachtet — und dies erscheint auf Grund gewisser Versuche als wesentlich —, dass die übrigen Tiere das Läuten nicht hörten. Nach Ablauf der 20 Tage wurde eine Pause von 8 Tagen eingeschaltet, wonach am 9. Tage die Auslösung des bedingten Reflexes erfolgte, und zwar durch Läuten und bei einem Teil der Tiere durch Stechen mit der Nadel ohne Gabe von Adrenalin.

Die Ergebnisse sind in *Abb. 1* und in Tabelle I dargestellt. Im oberen Teil der Abbildung ist das Resultat eines Kontrollversuches zu sehen, in dem

2 Stunden nach der einmaligen Gabe von 0,04 mg/100 g Adrenalin die Veränderung des Askorbinsäuregehaltes der Nebenniere festgestellt wurde. Der Askorbinsäuregehalt der Nebenniere sank vom normalen Wert von 440 γ/100 mg auf einen Wert von 270 γ/100 mg. (Die unter den Kolonnen befindlichen Zahlen bezeichnen die Zahl der Versuchstiere, während die in Klammern stehende Zahl die signifikante Differenz bedeutet.) Der untere Teil der Abbildung zeigt das Ergebnis des Versuches mit dem bedingten Reflex zwei Stunden nach seiner Durchführung. Von den zwei Kontrollgruppen wurden die Tiere

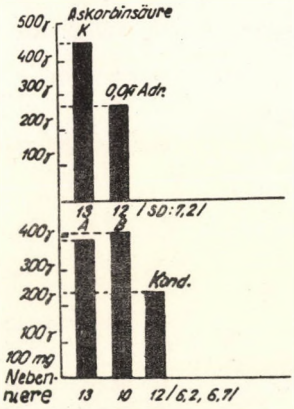


Abb. 1. Askorbinsäuregehalt der Nebenniere. Obere Reihe: 2 Stunden nach Gabe von 0,04 mg/100 g Adrenalin s. c. Untere Reihe: 2 Stunden nach Auslösung des bedingten Reflexes

der mit »A« bezeichneten Gruppe 20 Tage hindurch sowie am 29. Tage zum Teil nur Läuten und zum Teil Läuten mit nachfolgendem Stechen mit der Injektionsnadel — jedoch immer ohne die Gabe von Adrenalin — ausgesetzt. Durch diese Behandlung sollte die den Askorbinsäuregehalt der Nebenniere senkende Wirkung des Läutens bzw. des Stechens ausgeschlossen werden. Die Tiere der mit »B« bezeichneten Kontrollgruppe erhielten 20 Tage hindurch täglich 0,04 mg/100g Adrenalin, worauf am 29. Tage einfach der Askorbinsäuregehalt ihrer Nebennieren bestimmt wurde. Dadurch sollte die eventuelle dauernde askorbinsäurevermindernde Wirkung der chronischen Adrenalinverabreichung ausgeschlossen werden. Wie aus der Abbildung ersichtlich, gelang die Ausbildung des bedingten Reflexes, der Askorbinsäuregehalt der Nebenniere der konditionierten Ratten sank auf 236 γ/100 mg im Vergleich zum Werte von 383 γ/100 mg bzw. 405 γ/100 mg der Kontrolltiere.

Bei einer Gruppe von 5 Ratten wurden die Tiere täglich ausser der Konditionierung auch mehrmals Läuten ausgesetzt, ohne dass ihnen das den unbedingten Reiz bildende Adrenalin gegeben wurde. Bei diesen Tieren entwickelte sich kein bedingter Reflex. (Die erhaltenen Werte sind: 500, 408, 480, 426, 360 γ/100 mg). Dieser Versuch beweist einerseits, dass der in Ver-

bindung mit der Adrenalinwirkung ausgebildete bedingte Reflex zum Erlöschen gebracht werden kann, und weist andererseits darauf hin, dass der Schallreiz der bedeutendste Konditionierungsfaktor ist, obgleich offenbar auch die ganze Situation des Versuches bei der Konditionierung eine gewisse Rolle spielen kann.

TABELLE I

Art des Versuches	Askorbinsäuregehalt der Nebenniere	Durchschnitt
a) Wirkung des Adrenalins auf den Askorbinsäuregehalt der Nebenniere		
Kontrollgruppe	419, 384, 464, 492, 471, 511, 458, 490, 452, 427, 415, 386, 341	440
2 Stunden nach Gabe von 0,04 mg/100 g Adrenalin s. c.	235, 283, 252, 280, 276, 254, 242, 110, 250, 377, 273, (418)...	270
b) Ausbildung des bedingten Reflexes in Verbindung mit der Wirkung von Adrenalin		
Kontrollgruppe »A«	355, 470, 305, 351, 435, 327, 318, 314, 382, 440, 340, 488, 460	383
Kontrollgruppe »B«	400, 340, 348, 428, 407, 390, 380, 546, 460	405
Nur durch bedingten Reiz hervorgerufene Wirkung an konditionierten Ratten	200, 226, 298, 275, 209, 224, 172, 172, 211, 215, 357, 270	236
c) Wirkung einer elektrischen Schlagserie auf den Askorbinsäuregehalt der Nebenniere		
Kontrollgruppe	589, 644, 706, 544, 464, 654, 576, 511, 523, 564, 592	579
1 Stunde nach einer Serie von elektrischen Schlägen	476, 400, 422, 465, 390, 447, 358, (572)	445
d) Ausbildung des bedingten Reflexes in Verbindung mit einer elektrischen Schlagserie		
Kontrollgruppe	498, 453, 420, 469, 426, 441, 575, 502, 370, 300, 360, 375	436
Nur durch bedingten Reiz hervorgerufene Wirkung an konditionierten Tieren	259, 325, 284, 385, 360, 329, 312, 282, 252, 358	305

Die Versuche *a/*, *b/* und *d/* erfolgten an Ratten gleichen Stammes, Versuch *c/* an Ratten eines anderen Stammes. Die zwei in Klammern stehenden Werte sind zweifelhaft, da die Differenz zwischen dem Askorbinsäuregehalt der beiden Nebennieren wesentlich grösser als gewöhnlich ist.

Bisher wurde der bedingte Reflex in Verbindung mit dem Adrenalin ausgebildet, das nach dem Umweltseinfluss das nächste Glied in der Kette des »Stress«-Prozesses ist. Im weiteren wurde versucht, den schädlichen Umweltseinfluss selbst zu konditionieren.

In der nächsten Versuchsreihe wurde deshalb die durch eine elektrische Schlagserie hervorgerufene Verminderung des Askorbinsäuregehaltes der Neben-

niere mit dem bedingten Reiz in Verbindung gebracht. Die Ratten wurden in einem Rohr gehalten, das mit einer durchsichtigen Glasscheibe abgeschlossen war. An ihre Hinterbeine wurden Elektroden befestigt. Vor dem Rohr, in dem sich die Ratten befanden, wurde eine Lichtquelle aufgestellt. Der Versuch erfolgte auf folgende Weise : im Laufe von 4 Tagen wurde bei 80—120 Gelegenheiten die kombinierte Reizung angewandt, und zwar wurden die Tiere jede halbe Minute einem 5 Sekunden dauernden Lichtreiz und danach einem kurzen elektrischen Schlag (mit 120 V Gleichstrom aus einer Anodenbatterie) ausge-

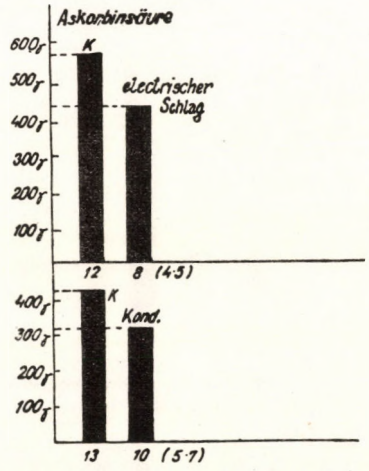


Abb. 2. Askorbinsäuregehalt der Nebenniere. Obere Reihe : 1 Stunde nach elektrischen Schlägen
Untere Reihe : 1 Stunde nach Auslösung des bedingten Reflexes

setzt. Nach der letzten kombinierten Reizung wurde eine Pause von 48 Stunden eingeschaltet und dann am 6. Tag der bedingte Reflex ausgelöst. Dies geschah so, dass 30mal nur die Lichtreizung in der gewohnten Weise, doch ohne elektrischen Schlag angewandt wurde. Eine Stunde später wurde dann der Askorbinsäuregehalt der Nebenniere bestimmt. Bei den Ratten der Kontrollgruppe wurde 4 Tage hindurch bei insgesamt 80—120 Gelegenheiten, sodann am 6. Tage bei 30 Gelegenheiten nur der Lichtreiz angewandt. Nach den ersten 4 Tagen wurde deshalb vor der Auslösung des bedingten Reflexes eine 48stündige Pause eingeschoben, weil laut den Beobachtungen der Askorbinsäuregehalt der Nebenniere 48 Stunden nach einer 4tägigen Behandlung mit 80—120 elektrischen Schlägen normal ist. Die Versuchsergebnisse werden auf *Abb. 2* und in Tabelle I gezeigt. Der obere Teil der Abbildung stellt den Kontrollversuch dar, der nach 30 elektrischen Schlägen von 120 V den Askorbinsäuregehalt der Nebenniere nach 1 Stunde angibt. Im Laufe dieses Kontrollversuches befanden sich die Ratten nicht in der gewohnten Weise im Fixierrohr: ihre Bewegung wurde in keinerlei Weise behindert. Das Resultat des Versuches

mit dem bedingten Reflex ist im unteren Teil der Abbildung veranschaulicht. Demgemäss wurde also durch den bedingten Reflex (Lichtreiz) die gleiche Senkung des Askorbinsäuregehaltes der Nebenniere der konditionierten Ratten hervorgerufen wie durch den elektrischen Schlag im Kontrollversuch. Interessant ist, dass der Askorbinsäuregehalt der Nebenniere bei der Kontrollgruppe im Versuch mit dem bedingten Reflex sich auf einem normalen Niveau bewegte (436 γ/100 mg), obwohl die Ratten in einem vorne mit Glas abgeschlossenen Rohr fixiert waren. Aus Literaturangaben (5) war nämlich bekannt, dass die Immobilisierung eine Steigerung der Nebennierenrinden-Funktion

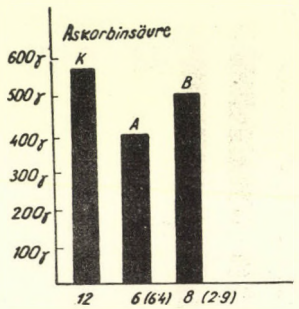


Abb. 2. Askorbinsäuregehalt der Nebenniere. K: an Kontrolltieren; A: nach einmaliger Immobilisation; B: nach Immobilisation nach erfolgter Gewöhnung

zur Folge hat. Diese Frage wurde deshalb im weiteren gleichfalls einer Prüfung unterzogen *(Abb. 3)*.

Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, ist die Senkung des Askorbinsäuregehaltes der Nebenniere in jenem Falle, wo die Ratte zum ersten Mal im Fixierrohr immobilisiert wird, tatsächlich bedeutend. Wenn aber die Ratte 4 Tage nacheinander und dann wieder am 6. Tage in das Fixierrohr gesperrt wird, ist die Senkung wesentlich geringer und infolge der Streuung nicht signifikant. Diesem Versuche zufolge verringert sich also bei Ratten die »Stress«-Wirkung der Immobilisation wegen der Gewöhnung. Dieses Resultat steht mit den Beobachtungen von *Vogt* (14) in bestem Einklang, laut welchen die Ratte imstande ist, sich an die Aftertemperaturmessung als durch eine »Emotion« hervorgerufene Wirkung im Laufe von Wiederholungen zu gewöhnen.

Diskussion

Die Tatsache, dass in Verbindung mit der Aktivierung des Hypophyse-Nebennierenrinde-Systems ein bedingter Reflex ausgebildet werden kann, stellt die bis zu einem gewissen Grade noch umstrittene Frage klar, ob der »Stress«-Prozess ein humoraler oder neurohumoraler Reflexprozess ist, da sich

natürlich nur eine Nerventätigkeit konditionieren lässt. In anderen Versuchen wiesen die Verfasser darauf hin (15), dass das Trauma das Hypophyse-Nebennierenrinde-System über afferente, durch das Rückenmark hindurchgehende Nerven mobilisiert. Es gelang nämlich durch Durchschneidung des Rückenmarks in der Höhe des D 1—2 Segmentes die durch die Nebennierenexstirpation (als Operation) hervorgerufene Verminderung des Askorbinsäuregehaltes der anderen Nebenniere zu vereiteln. Dieses Ergebnis legte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Thalhammer* (16), *Hume* und *Wittenstein* (17) und *Gordon* (18) den afferenten Weg des Reflexes klar. Wenn man die obigen Ergebnisse mit den in der Einleitung erwähnten anderen Ergebnissen vergleicht, so ist der Schluss zulässig, dass der »Stress«-Prozess ein neurohumoraler Abwehrreflex des Organismus ist. Bei Berücksichtigung des durch die obigen Versuchsergebnisse bestätigten Umstandes, dass in Verbindung mit der Funktion des Hypophyse-Nebenniere-Systems ein bedingter Reflex ausgebildet werden kann, darf angenommen werden, dass auch im Zusammenhang mit den in der Natur vorkommenden Schäden und »Stressen« mit Hilfe zahlreicher Umweltsfaktoren zeitweilige Verbindungen, natürliche bedingte Reflexe ausgebildet werden, die dann wohl auch in der menschlichen Pathologie eine Rolle spielen.

Zusammenfassung

1. Es wurde ein bedingter Reflex in Verbindung mit der durch Adrenalin und elektrische Schlagserien verursachten Verminderung des Askorbinsäuregehaltes der Nebenniere ausgebildet.

2. Aus dem Vergleich der Versuchsergebnisse mit anderen Angaben kann die Folgerung gezogen werden, dass das Hypophyse-Nebennierenrinde-System eines der neurohumoralen Abwehrreflexsysteme des Organismus ist, in dessen Lenkung bei einem unversehrten Organismus die Gehirnrinde mittels zeitweiiger Verbindungen eine zentrale Rolle spielt.

LITERATUR

1. *Pawlow, I. P.:* Vorträge über die Funktion der Grosshirnhemisphären, Budapest (1953) (ungarisch).
2. *Selye, H.:* Annual Reports on Stress, Montreal, (1951).
3. *Pincus, G.:* Proc. of the First Clin. ACTH Conf. Philadelphia (1950).
4. *McDermott, W. V.* und *Mitarbeiter:* cit. Vogt, M. I. Physiol. **114**, 465 (1951).
5. *Fortier, C.:* cit. Harris, H. Brit. Med. Journal **2**, 627 (1951).
6. *Endrőczi, E., Nagy, D.:* Acta Phy iol. Hung. **2**, 1 (1951)
7. *Endrőczi, E., Nagy, D.:* Acta Physiol, Hung. **3**, 2 (1952).
8. *Csordás, D., Endrőczi, E., Lissák, K.:* Acta Physiol. **3**, 2 (1952).
9. *Endrőczi, E., Lissák, K.:* Vortrag auf dem Kongress d. Ung. Physiol. Ges. 1952.
10. *Bykow, K. M.:* Опыт изучения регуляций физиопогических функций, Москва-Ленинград (1949). Agykéreg és a belső szervek. Budapest 1953
11. *Roe, J. H., Kuether, C. A.:* J. Biol. Chem. 149—3 (1943).
12. *Geschwind, I. I.* und *Mitarbeiter:* Acta Endocrin. **8**, III—247, (1951).

13. *Tschernikow, Jukaschinskaja :* Bull. Biol. et Med. exp. URRS (1942).
14. *Vogt, M. J.:* Physiol. **114**, 465 (1951).
15. *Weisz, P., Gláz, E., Vasenszky :* Sz. Orvosi Hetilap **44**, 1248 (1952).
16. *Thalhammer, O.:* Wiener Klin. Wschrift, **64**, 35/36—729 (1952).
17. *Hume, D. M., Wittenstein, G. J.:* Proc. of the First Clin. ACTH Conf. Philadelphia (1950).
18. *Gordon, M.:* Endocrinology **47**, 347 (1950).

ВЫРАБОТКА УСЛОВНЫХ РЕФЛЕКСОВ НА ФУНКЦИЮ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКА

П. Вейс, Э. Глаз, П. Кертаи, К. Вейс, С. Вашенский и Т. Гати

Патологический институт и III Терапевтическая клиника медицинского университета, Будапешт

Р е з ю м е

Авторами были выработаны условные рефлексы у белых крыс на функцию коры надпочечника. Было исследовано повышение функции коры надпочечников в связи с уменьшением содержания аскорбиновой кислоты надпочечника. В одном из своих опытов авторы кондиционировали уменьшение содержания аскорбиновой кислоты надпечечника, — вызванное адреналином, — со звонком колокола. В другом опыте они сочетали повышение функции коры надпочечника, — вызванное серией импульсов электрического тока, — световым раздражением.

Сравнивая результаты своих опытов другими данными, авторы пришли к заключению, что система гипофиз-кора надпочечников является одной из систем неврогуморальных оборонительных рефлексов. Основную роль в управлении этой системой — в случае целостного организма—играет кора головного мозга путем временных связей.

BEEINFLUSSUNG DER EXPERIMENTELLEN NEUROGENEN HYPERTONIE DURCH MEDIKATION UND DIÄT BEI RATTEN

M. HÄNDEL, P. KERTAI, J. SÓS, K. WEISZ und I. BALKÁNYI

PATHOPHYSIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen: am 9. Februar 1952)

Gestützt auf die Lehren *Pawlows* hat *Lang* (1) eine Theorie über den Ursprung der Hypertoniekrankheit im Zentralnervensystem ausgearbeitet. *Tarajew* (2) sieht die Ursache der Hypertoniekrankheit im gesteigerten Einfluss der aus der Hinrnrinde ausgehenden kortikoviszeralen Impulse. *Anochin* (3) ist es gelungen, durch Reizung des Vasomotorenzentrums mit Kathodenstrom experimentell chronische Hypertonie hervorzurufen. Bei den im nachstehenden geschilderten Versuchen gingen auch die Verfasser von der Auffassung aus, dass in der Pathogenese der Hypertoniekrankheit die Hauptrolle den Aussenfaktoren zukommt, die über die Analysatoren in die Hirnrinde und die subkortikalen Zentren gelangen. Von diesen ätiologischen Faktoren sind es die sich wiederholenden exterozeptiven Reize bzw. psychisch-emotionalen Reizzustände, sowie die Überanstrengung, welche die Disharmonie zwischen Kortex und Subkortex verursachen. Ihre pressorische Wirkung kommt dadurch zustande, dass infolge dieser Aussenreize die grossen Blutdruckschwankungen den Depressorapparat erschöpfen und schliesslich zu dessen Ungenügen führen. *Sowetow* (4), der durch kontinuierlichen Sirenenklang am Hund einen bedingten Reflex in Verbindung mit der Speichelabsonderung ausbildete, beschreibt, dass sich der Blutdruck am Anfang erhöht. Bei Vertauschung von positiven und negativen Reizen konnte er immer eine Zunahme des Blutdruckes beobachten, wobei nach ihrem stereotypen ständigen Wechsel eine chronische Blutdruckerhöhung eintrat. *Makaritschew* und *Kurzin* (5), die eine bedingte Hypertonie durch Adrenalin ausgebildet haben, bemerken, dass die Umbildung des bedingten Reflexes den hypertonischen Zustand noch mehr steigert. *Tschernigowski* und *Jaruscheski* (6) weisen gleichfalls darauf hin, dass die experimentelle Neurose grosse Blutdruckverluste verursacht, sowie auch auf die Tatsache, dass durch Veränderung der kortikalen Dynamik 5 Monate hindurch eine Blutdrucksteigerung aufrecht erhalten werden kann. *Medoff* und *Bongiovanni* (7) haben an Ratten, die Schallwirkungen ausgesetzt waren, Hypertonie beobachtet und in diesem Krankheitsprozess die Rolle des Zentralnervensystems vermutet.

Bei Berücksichtigung der aufgezählten Tatsachen wurde versucht, eine experimentelle Hypertonie hervorzurufen, die als Folge von zusammengesetzten

Aussenreizen zustande kommt. Gleichzeitig wurde auch jene Wahrnehmung *Langs* experimentell untersucht (8), die sich auf die alimentären Beziehungen der sog. Leningrader Hypertonie beziehen. *Lang* machte nämlich die Beobachtung, dass während der Belagerung von Leningrad, in einer Zeit von mangelhafter Ernährung, die Zahl der Hypertoniekranken trotz der bestehenden starken Reizungen abnahm. Nach der Aufhebung der Belagerung und nach der Verbesserung der Nahrungsverhältnisse trat die Krankheit auffallend häufig und stark in Erscheinung, obgleich die starken Reize nicht mehr bestanden. Dieses Phänomen wurde in der hier beschriebenen Versuchsreihe ebenfalls einer Untersuchung unterzogen. Die Tiere wurden auf einer Mangeldiät gehalten, die arm an qualitativen Eiweissstoffen war (13), wobei sie den obenerwähnten starken und komplexen Aussenreizen ausgesetzt wurden.

Methodik

Zu den Versuchen wurden weisse Ratten verwendet. Die Tiere wurden in Kisten von 60 cm Länge, 44 cm Breite und 40 cm Höhe gehalten. Diese Kisten bestanden aus einem Metallrahmen und gläsernen Wänden. Auf den Boden der Kiste wurde ein dünner, mit einem dichten dünnen Draht überzogener Holzrahmen gelegt und daran ein mit einem Akkumulator von 6 V, verbundener Funkeninduktor angeschlossen. In der Kiste befand sich in einer Entfernung von 10 cm von den Tieren eine Glühlampe von 500 W. Die Tiere wurden auf dreierlei Art gereizt :

a) dreimal täglich 10 Minuten hindurch erfolgte eine Schallreizung mit einer Pfeife, die durch eine *Mayer*sche Pumpe betätigt wurde ;

b) dreimal täglich erfolgte eine elektrische Reizung, und zwar erhielten die Tiere, während sie mit nassen Füssen auf dem Drahtgitter standen, einen mehrere Sekunden dauernden elektrischen Schlag ;

c) dreimal täglich erfolgte eine je 10 Minuten dauernde Lichtreizung durch Anzünden der Glühbirne. Der Blutdruck der Tiere wurde mit dem *Herr*schen Photozellen-Blutdruckmessapparat gemessen (14).

Zu Beginn des Versuches waren die Tiere unruhig, sprangen auf, versuchten aus der Kiste zu entfliehen. Vom 5.—6. Tage an blieben die Tiere während der Reizung aneinander geschmiegt und unbeweglich den ganzen Tag in der Versuchskiste. Von hier wurden sie am Nachmittag zwischen 4 und 5 Uhr in ihren normalen Käfig zurückgebracht, wo sie auch ihr Futter erhielten. Dort blieben sie dann bis zum nächsten Tag bis 9 Uhr früh, als sie für den neuen Versuchstag wieder in die Reizkiste gelegt wurden.

Ergebnisse

Die Tiere wurden in folgende sechs Gruppen eingeteilt :

1. *Gruppe :* 17 weisse Ratten von einem Gewicht von je 120—150 g. Die Tiere wurden dreimal täglich 40 Tage hindurch den oben beschriebenen Reizungen ausgesetzt. Ihr Blutdruck wurde während den Reizungen alle 10 Tage sowie 2 und 4 Wochen nach Beendigung der Reizungen gemessen. Aus den Ergebnissen (Tabelle I) ist ersichtlich, dass am 40. Tage sich bei 14 von den 17 Tieren eine Hypertonie ausgebildet hat. Nach Beendigung der Reizung war nach 2 bzw. 4 Wochen noch bei 50% eine Hypertonie vorhanden, doch auch bei den restlichen Tieren fiel der Blutdruck nicht auf den Ausgangswert zurück,

obgleich er sich gesenkt hatte. Von dieser Gruppe wurden 5 Tiere histologisch aufgearbeitet. Die Nieren wiesen eine schwere degenerative Veränderung auf, die an vielen Stellen in Nekrose überging.

TABELLE I

Durch Aussenreize hervorgerufene Blutdruckerhöhung

Versuchstag	Zahl der Tiere			Durchschn. Blutdruck Hg mm	Anmerkung
	mit normalem Blutdruck bis 110 Hg mm	110—150 Hg mm	mit Hypertonie über 150 Hg mm		
	16	1	0	107	
10	5	10	1	125	1 nicht gemessen
20	0	6	11	148	
30	0	3	13	153	
40	0	3	14	153	5 getötet
	Einstellung der Reizung				
40+14	0	8	4	140	
40+28	0	7	4	141	

2. *Gruppe :* 11 weisse Ratten von einem Gewicht von je 120—150 g. In dieser Versuchsreihe wurde der Erregungszustand des Zentralnervensystems ständig aufrechterhalten, wobei die Tiere den oben beschriebenen Reizungen 40 Tage hindurch ausgesetzt wurden. Inzwischen erhielten sie während 20 Tage dreimal täglich subkutan 3 mg/100 g (also eine subkonvulsive Dosis) Tetracor (Pentamethylen-tetrazol).

Aus Tabelle II ist ersichtlich, dass am 40. Tage alle Tiere hypertonisch waren. Nach der 2. bzw. 4. Woche nach Abschluss der Reizbehandlung ist bei allen noch am Leben gebliebenen Tieren Hypertonie zu beobachten. Wiederum wurden 5 Tiere histologisch aufgearbeitet. Bei 4 von den 5 Tieren war in der Nierenrinde eine schwere degenerative Veränderung der gewundenen Tubuli feststellbar, die Tubulus-Zellen waren geschwollen, desquamiert und an zahlreichen Stellen nekrotisiert. Die Glomeruli waren blutreich, in dem einen oder anderen Glomerulus war eine seröse Transsudation zu sehen. Im Vergleich zur ersten Gruppe hat sich das Krankheitsbild infolge des Einflusses des Tetracors verschlechtert.

3. *Gruppe :* 11 weisse Ratten von einem Gewicht von je 120—150 g. Die Tiere erhielten 20 Tage hindurch dreimal täglich 3 mg/100 g Tetracor s. c. Diese Gruppe war keinen Aussenreizen ausgesetzt. Es stellte sich heraus, dass während der Verabreichung von Tetracor sich keine ausgeprägte Hypertonie ausgebildet hatte ; 7 Tage nach Einstellung der Tetracorgaben zeigte 1 Tier vorübergehend die Zeichen von Hypertonie, nach 2 Wochen war Hypertonie vorübergehend

TABELLE II

Durch Aussenreize und Tetracor hervorgerufene Blutdruckerhöhung

Versuchstag	Zahl der Tiere			Durchschn. Blutdruck Hg mm	Anmerkung
	mit normalem Blutdruck bis 110 Hg mm	110—150 Hg mm	mit Hypertonie über 150 Hg mm		
1	8	3	0	109	
10	0	11	0	127	
20	0	6	5	142	
30	0	4	7	150	2 getötet
40	0	0	9	154	2 getötet
	Einstellung der Reizung				
40+14	0	0	7	155	1 getötet
30+28	0	0	6	155	

an 3 Tieren zu beobachten, nach 4 Wochen jedoch an keinem einzigen Tiere mehr.

TABELLE III

Die Wirkung von Tetracorinjektionen auf den Blutdruck

Versuchstag	Zahl der Tiere			Durchschn. Blutdruck Hg mm	Anmerkung
	mit normalem Blutdruck bis 110 Hg mm	110—150 Hg mm	mit Hypertonie über 150 Hg mm		
1	9	2	0	107	
10	0	11	0	129	
20	0	11	0	135	
	Einstellung der Injektionen				
20+ 7	0	10	1	137	
20+14	0	7	3	139	
20+28	0	10	0	132	

4. *Gruppe :* 10 weisse Ratten von einem Gewicht von je 120—150 g. Die Tiere wurden 20 Tage lang auf einer fast vollkommen methioninlosen und teilweise triptophanarmen Diät gehalten (13). Die Aussenreize wurden wie bei der 1. und 2. Gruppe 40 Tage hindurch verabreicht.

Während der Dauer der Diät ist die Blutdruckerhöhung wesentlich geringer als bei den vorigen Gruppen, deren Tiere auf normaler Diät gehalten wurden. Nach Einstellung der Mangeldiät stieg der Blutdruck sichtlich an. Diese Blutdruckerhöhung hielt auch an, als die Tiere keinen Aussenreizen mehr ausgesetzt wurden. Zu diesem Zeitpunkt betrug der Blutdruck keines einzigen Tieres weniger als 140 Hg mm. In der 6. Woche nach dem Versuchsbeginn war bei jedem

der am Leben gebliebenen Tiere Hypertonie zu beobachten. 5 Tiere wurden wieder histologisch aufgearbeitet. In der Leber dieser Tiere konnte — ausser den bei den früheren Gruppen wahrgenommenen Nierenveränderungen — eine degenerative Veränderung festgestellt werden, die bei keiner der anderen Gruppe zu sehen war.

TABELLE IV

Die Wirkung von qualitativem Eiweissmangel auf den Blutdruck

Versuchstag	Mit normalem Blutdruck bis 110 Hg mm	110—150 Hg mm	Mit Hypertonie über 150 Hg mm	Durchschn. Blutdruck Hg mm	Anmerkung
1	10	0	0	106	
20	0	10	0	123	
	Übergang von Mangeldiät auf Normaldiät				
20+14	0	9	1	139	
	Einstellung der Reizung				
20+28	0	7	3	146	5 getötet
20+56	0	0	5	155	

5. *Gruppe :* 9 weisse Ratten von einem Gewicht von je 120—150 g. Die Tiere erhielten zweimal täglich 5 mg/100 g Sevenal s. c. und 40 Tage hindurch die im vorstehenden beschriebenen Aussenreize. Am 40. Tage waren 2 von 9 Tieren

TABELLE V

Wirkung von Sevenal auf die durch Aussenreize hervorgerufene Hypertonie

Versuchstag	Mit normalem Blutdruck bis 110 Hg mm	110—150 Hg mm	Mit Hypertonie über 150 Hg mm	Durchschn. Blutdruck Hg mm	Anmerkung
1	7	2	0	109	
10	0	9	0	127	
20	0	8	1	135	
30	0	8	1	138	
40	0	7	2	142	4 getötet
40+14	0	5	0	133	

hypertonisch, während 2 Wochen nach Einstellung der Reizbehandlung kein einziges der überlebenden Tiere Hypertonie aufwies.

In der nächsten, der 6. Versuchsreihe wurden die sofortigen Blutdruckveränderungen der Tiere beobachtet, die infolge der beschriebenen Reizungen und der Verabreichung der obigen Pharmaka eintraten. In dieser Versuchsreihe wurde auch untersucht, ob die Fesselung der Tiere im Behälter des Blutdruck-Messapparates sowie der Stich mit der Injektionsnadel eine Blutdruckerhöhung

zur Folge habe. Dieser akute Versuch wurde mit Selbstkontrolle ausgeführt, weil das Ergebnis der verschiedenen Einwirkungen an denselben 6 Ratten gemessen wurde. Zwischen den einzelnen Versuchen wurde für die Tiere eine Ruhepause von je zwei Tagen eingeschaltet.

Die Ergebnisse werden in Abb. 1 gezeigt. Es ist ersichtlich, dass als Folge der Schallwirkung eine beträchtliche Blutdruckerhöhung zustande kommt, die in der 12. Minute ihr Maximum erreicht. Wenn der Schallreiz mit Tetracor kombiniert wird, so wird eine grössere Blutdruckerhöhung hervorgerufen als nur mit Schall allein, wobei diese Erhöhung sich auch über eine längere Zeitspanne

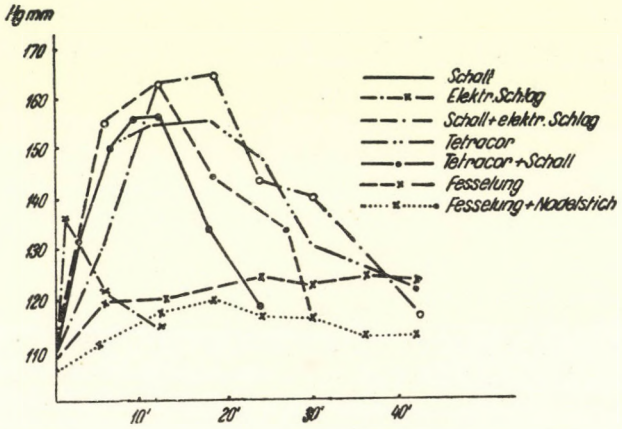


Abb. 1. Grösse und Dauer der akuten Blutdruckerhöhung infolge verschiedener Reize an Ratten Jede Kurve stellt den Mittelwert der an denselben 6 Tieren erhaltenen Ergebnisse dar.

erstreckt. Dieselbe Beobachtung kann gemacht werden, wenn der Schallreiz mit elektrischem Schlag kombiniert wird, obwohl die Erhöhung nur etwas kürzer dauert als im vorigen Fall. Bei Verabreichung von Tetracor ist eine etwas geringere, doch immerhin bedeutende Blutdruckerhöhung wahrzunehmen. Wenn die Tiere nur mit elektrischem Schlag gereizt werden, so ist die Blutdruckerhöhung wesentlich geringer als bei den vorigen Versuchen. Nach Fesselung der Tiere in den zum Blutdruck-Messapparat gehörenden Behälter und nach Stechen mit der Nadel trat keine bedeutendere Blutdruckerhöhung auf.

Diskussion

Aus den obenstehenden Ergebnissen ist ersichtlich, dass sich bei einem Grossteil der Tiere infolge der Wirkung dieser starken und kombinierten Reize Hypertonie ausbildet, die auch nach dem Einstellen der Reizungen chronisch bestehen bleibt. Hierbei spielt nicht nur die Intensität der Reize, sondern auch

der Nervensystemtypus der Tiere eine Rolle. Dies wird auch durch die Tatsache bewiesen, dass sich die Hypertonie nicht bei jedem Tiere entwickelt. Es hat also den Anschein, als ob die in den oben beschriebenen Versuchen hervorgerufene Hypertonie eine Folge der Störung der höheren Nerventätigkeit wäre. Es wurden zwar in der Niere der hypertonischen Tiere schwere pathologische Veränderungen gefunden, doch muss deren Rolle im Zustandekommen bzw. im Fortbestehen der Hypertonie noch in weiteren Versuchen geklärt werden. Es lässt sich also die Feststellung machen, dass infolge der Wirkung der äusseren, kombinierten Reize, die eine Neurose hervorrufen und auch in der menschlichen Hypertoniekrankheit eine Rolle spielen, auch in Ratten Hypertonie auftritt. Des weiteren bestätigen die Ergebnisse der auf Eiweissmangeldiät gehaltenen Ratten experimentell den Zusammenhang der alimentären und neutralen Faktoren der von *Lang* während der Belagerung von Leningrad beobachteten Hypertonie. Die Versuche erbringen aber auch den Beweis für die Richtigkeit der Beobachtungen von *Gömöri*, der eine Abnahme der Hypertonie von Leberkranken während der Dauer der Leberschädigung festgestellt hatte. Auch die auf Eiweissmangeldiät gehaltenen Tiere der früheren Versuche der Verfasser (13) und der allgemein bekannten Literaturangaben wiesen Leberschädigungen auf. Der Mechanismus dieses Prozesses soll in weiteren Versuchen klargestellt werden. Die mit Tetracor ausgeführten Versuche zeigen, dass die Aussenreize eine stärkere und andauerndere Wirkung ausüben, wenn der Erregungszustand des Zentralnervensystems grösser als normal ist. Die blutdruckerhöhende Wirkung des Tetracors spielt zwar eine gewisse Rolle, doch stellt nicht diese Wirkung den entscheidenden Faktor dar, sondern die auf das ganze Zentralnervensystem ausgeübte Reizwirkung des Tetracors. Dies geht auch daraus hervor, dass unter den beschriebenen Versuchsverhältnissen die alleinige Verabreichung von Tetracor keine Hypertonie verursacht.

Die angewandten Aussenreize wirken über das Zentralnervensystem, im gegenwärtigen Falle spielt also bei der Ausbildung der Hypertonie das Zentralnervensystem neben anderen Faktoren in der Auslösung des Prozesses eine entscheidende Rolle. Als übrige Faktoren im Mechanismus dieses Prozesses kommen die Niere sowie die Nebenniere in Betracht (10, 11, 12).

Zusammenfassung

1. Infolge der Wirkung von ständigen, starken und kombinierten Aussenreizen wurde an Ratten Hypertonie bzw. eine bedeutende Blutdruckerhöhung hervorgerufen.

2. Die Verabreichung von subkonvulsiven Dosen von Tetracor (Pentamethylen-tetrazol) kombiniert mit Aussenreizen verursacht die Fortdauer der Blutdruckerhöhung bzw. der Hypertonie. Die Verabreichung von Tetracor allein

bringt keine ausgesprochene Hypertonie zustande, die Blutdruckerhöhung ist nur geringfügig.

3. Während der Dauer einer Mangeldiät an qualitativen Eiweissstoffen ist die Blutdruckerhöhung trotz Anwendung von Aussenreizen minimal. Nach Einstellung der Diät tritt Hypertonie oder zumindest eine bedeutende Blutdruckerhöhung ein, die auch nach Unterbrechung der Aussenreize bestehen bleibt.

Hier sei Prof. *I. Tarján*, dem Dir. des Med. Physik. Institutes, für seine Unterstützung der Ausführung der Experimente, sowie *A. Schultz* für die tatkräftige technische Hilfe der beste Dank ausgesprochen.

LITERATUR

1. Ланг Г. Ф.: Гипертоническая болезнь, Medgiz 495 (1950).
2. *Tarajew, J. M.:* Советская Медицина, **1**, 1 (1950).
3. *Anochin, P. K.:* Клиническая Медицина, **27**, 9 (1949).
4. *Sowetow, A. H.:* Ж.В.Н.Д. **II.** 2, 182 (1952).
5. *Makaritschew, A. J. Kurzin, O. I.:* Ж.В.Н.Д. **I.** 2, 199 (1951).
6. *Tschernigowski, W. N., Jaroschewski, A. J.:* Ж.В.Н.Д. **II.** 1, 30 (1952).
7. *Medoff, H. S., Bongiovanni, A. V.:* Am. J. Physiol. **143**, 300 (1945).
8. Ланг Г. Ф.: Гипертоническая болезнь, Medgiz 495 (1950).
9. *Gömöri, P.:* Zeitschr. f. ärztl. Fortbildung, (1953).
10. *Fortier, C.:* Proc. Canad. Physiol. Soc. 13. Meet. Act. (1949).
11. *Fortier, C., Irrarazovar, N.: Selye, H.:* cit. Ann. Rep. on Stress. Montreal (1951).
12. *McCann, S. M., Rothballer, A. D., Jaeckel, E. H., Schenkin, H. A.:* Am. J. Physiol. **155**, 128 (1948).
13. *Sós, J.:* Kísérletes Orvostud. **2**, 306 (1950).
14. *Herr, F.:* Kísérletes Orvostud. **2**, 369 (1950).

ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВ И РЕЖИМА ПИТАНИЯ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНУЮ НЕЙРОГЕННУЮ ГИПЕРТОНИЮ У КРЫС

М. Гендель, П. Кертаи, И. Шош, К. Веис и И. Балкани

Патофизиологический институт медицинского университета, г. Будапешт

Резюме

1. Авторами было вызвано у крыс применением внешних длительных, сильных и сложных раздражителей (звук, свет и раздражение электрическим током) гипертония, или же значительное повышение кровяного давления.

2. Дозировка тетракора (пента-метилен-тетразол) в подконвульсивных дозах, комбинирована внешними раздражителями упрочивает повышение кровяного давления, или гипертонию. Дозировка тетракора сама по себе не вызывает значительной гипертонии, и повышение кровяного давления менее выраженное.

3. Во время качественно малобелковой диэты, несмотря на нанесение внешних раздражений, повышение кровяного давления незначительное. После прекращения диэты возникает гипертония, или по крайней мере значительное повышение кровяного давления, продолжающиеся и после прекращения внешнего раздражения.

Pharmacologia

BEITRÄGE ZUR PHARMAKOLOGIE VOM TRYPTAMIN, TYRAMIN UND PHENYLAETHYLAMIN

Von

L. GYERMEK

FORSCHUNGSINSTITUT DER PHARMAZEUTISCHEN INDUSTRIE, BUDAPEST

(Eingegangen: am 2. Dezember 1952)

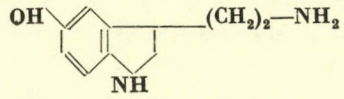
Die Isolierung eines im Serum enthaltenen vasokonstriktorischen Stoffes : des 5-hydroxytryptamins [Serotonin (1)] lenkte die Aufmerksamkeit auch in pharmakologischer Hinsicht auf diesen Stoff, dessen pharmakologische Daten kürzlich vom *Freyburger* und seinen Mitarbeitern (2), sowie von *Page* (3) bekanntgegeben wurden. Die Entdeckung des Serotonins rückte auch die pharmakologische Erforschung der chemisch ähnlich zusammengesetzten Amine, wie die vom Tryptamin (2, 4), von einigen Tryptaminderivaten (7) und vom Tyramin (2) in den Vordergrund, über die im bisherigen Schrifttum verhältnismässig wenig Daten zur Verfügung standen.

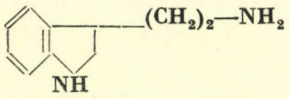
Die chemische Struktur des Serotonins hat eine Ähnlichkeit mit den sympathikomimetisch wirkenden Phenyl-alkylaminderivaten, deren Wirkungen im allgemeinen durch die sogenannten Adrenerg-Lähmungsstoffe gehemmt werden können. Nach den bisherigen pharmakologischen Daten zeigen aber diese Stoffe dem Serotonin und Tryptamin gegenüber nur eine schwache Hemmwirkung (2).

Diese Erkenntnis, sowie die Annahme, dass das Serotonin in der Entwicklung der Hypertonie eine Rolle spiele, bewog in der letzteren Zeit *Wooley* (6), sich mit den dem Serotonin gegenüber spezifisch wirkenden antagonistischen Substanzen zu befassen und es gelang ihm auch, einige wirksame 5-Aminoindolderivate herzustellen.

Bei der Forschung spezifischer antagonistischer Verbindungen, die ihre Wirkung vermutlich auf kompetitivem Wege ausüben, ist die gründliche Kenntnis der antagonistischen Substanz bezüglich ihrer chemischen Struktur und Wirkung von hervorragender Wichtigkeit. Mit Rücksicht darauf, dass die vaskulären Wirkungen des Serotonins nicht einheitlich sind, und nach *Freyburger* (2) die Kombination verschiedener Wirkungen darstellen, erschien es geboten, vorläufig in Ermangelung von Serotonin gewisse pharmakologische Eigenschaften einiger Amine von ähnlicher chemischer Struktur und pharmakologischem Verhalten, wie Tryptamin, Tyramin und Phenylaethylamin, bezüglich einiger antagonistischer Verbindungen zu untersuchen.

Das Serotonin und Tryptamin haben eine zum Teil den sympathikomimetischen Aminen nahestehende, sowie dem Histamin ähnliche chemische Struktur.





Ihre Wirkungen sind durch Adrenerghemmungsstoffe nur wenig zu beeinflussen. Aus diesem Grunde, sowie auf Grund der Feststellungen von *Buchholz* und seinen Mitarbeitern (7), nach denen einzelne Antihistamine ausser dem Histamin, auch dem Tyramin gegenüber antagonistisch wirken, wollten wir vor allem die Frage untersuchen, in welcher Weise die vaskulären Wirkungen der pharmakologisch sich ähnlich verhaltenden Stoffe, wie Tryptamin, Tyramin und Phenylaethylamin, durch Antihistamine beeinflusst werden.

Methodik

Die Versuche führten wir grösstenteils an Katzen durch. Der Blutdruck wurde auf blutigem Wege in der arteria carotis communis mittels Hg-Manometer gemessen und die Stoffe in die Vena femoralis injiziert, und zwar vom Tryptamin (Indolyl-3-aethylamin), vom Tyramin (p-oxyphenylaethylamin) und vom Phenylaethylamin im allgemeinen je 0,2—1,0 mg/kg. In einigen Versuchen verabfolgten wir auch Histamin (0,2—1,0 μg/kg), Adrenalin und dl-noradrenalin (2—10 μg/kg) intravenös. Nach der Auslösung ungefähr gleicher Blutdruckerhöhungen führten wir, um die Gefahr der Tachyphylaxie zu vermeiden, die zu untersuchenden Lähmungsstoffe erst nach einer entsprechenden Pause (5—10 Minuten) zwischen den einzelnen Reaktionen ein. (Die Lähmungsstoffe waren die folgenden: Antergan (N, N-dimethyl, N' N' phenyl, Benzyl-aethylen-diamin HCl, Rhone Poulenc), Dehistin (N, N dimethyl, N' pyridyl N' benzyl, Aethylen-diamin HCl, sowie Trimeton (1 Phenyl-1-(2 pyridyl)-3-dimethylaminopropan) und Thephorin (2 Methyl-9-phenyl-2, 3, 4, 9, tetrahydro-1-pyridinden tartarat. Die obigen antihistaminartig wirkenden Stoffe verabfolgten wir in Dosen von 1—13 mg/kg.

Von den sympathischen Lähmungsstoffen untersuchten wir das Hydergin (CCK-179) (Sandoz) in Dosen von 0,1—0,3 mg sowie das von uns beschriebene sympathikuslähmende und antihistaminartig wirkende N-methyl-N (β-chloroetyl)-β-amino-aethyl-2-methyl (1-4-benzodioxan) Aether HCl (N-73). Nach Verabfolgung der Lähmungsstoffe führten wir, sobald sich der Blutdruck stabilisiert hat, sofort die zu untersuchende Amine ein. Da wir vielfach die Erfahrung gemacht hatten, dass die Wirkung der Lähmungsstoffe schnell aufhört, führten wir ungefähr 10 Minuten nach 2—3 pressorisch wirkenden Aminen, sowie ca. 15 Minuten nach der ersten Lähmungsdosis wieder den gleichen Lähmungsstoff ein.

Versuchsergebnisse

Die Mehrzahl unserer Versuchsergebnisse ist in Tabelle I zusammengestellt, wo die Dosen der Lähmungsstoffe und die Grösse der durch die verschiedenen Amine ausgelösten Blutdruckerhöhungen vor und nach Verabfolgung des Lähmungsstoffes sichtbar sind. Ferner ist aus der Tabelle ersichtlich, wie spät nach der Anwendung des Lähmungsstoffes die Einführung des zu untersuchenden Amins erfolgt war. Aus der Übersicht der Resultate geht es hervor, dass unter den antihistaminartig wirkenden Aminen das Antergan und Dehistin dem

TABELLE I

Beeinflussbarkeit der auf den Blutdruck geübten Wirkung verschiedener heterozyklischer Aminoaethyl-derivate

Zahl des Versuches	Lähmungsstoff	Histamin	Blutdruckreaktionen in Hg mm				
			Phenyl-aethyl-amin	Tyramin	Tryptamin	Adrenalin	Noradrenalin
1.	Kontrolle	—48	—48, 60	—22, 80	84	—	—
	5 mg Antergan	⌀	20	60	—	—	—
	3 mg Antergan	—	—	—	40	—	—
2.	Kontrolle	—	60	82	50	—	60
	5 mg Antergan	—	40	60	16	—	54
	nach 10′ Pause	—	—	62	34	—	—
	5 mg Antergan	—	40	—	34	—	—
	nach 5,0, dann 3,0 mg Pavatrin	—	—	—	30	—	—
3.	Kontrolle	—48	—	34	80	—	44
	8 mg Tephorin 20′ Pause	⌀	—	8	50	—	22
	10 mg Tryptephan 10′ Pause	—	—	—	70	—	—
	0,1 mg Hydergin 10′ Pause	—	—	—	60	—	10
	13 mg Tephorin	—	—	—	30	—	—
4.	Kontrolle	—	70	98	70	—	60
	5 mg Dehistin.....	—	22	26	20	—	90
	nach 10′ Pause	—	—	—	40	—	
	nach 20′ Pause	—	20	26	40	—	100
	nach 20′ Pause	—	24	—	40	—	—
	2,5 mg Dehistin	—	—	—	40	—	110
	nach 10′ Pause	—	—	—	66	—	—
	10 mg Tephorin	—	—	—	20	—	40
	nach 5′ Pause	—	—	—	24	—	—
5.	Kontrolle	—	—26, 56	40	—20, 70	40	—
	1,2 mg Dehistin	—	—30	10	—32, 64	40	—
6.	Kontrolle	30	—	70	50	50	—
	8 mg Dehistin 10′ Pause	⌀	—	10	46	—	—
	10 mg N-73	—	—	⌀	30	—6	—
7.	Kontrolle	—28	—	46	60	—	32
	2 mg Trimeton 10′ Pause	⌀	—	—	30	—	52
	5 mg Trimeton	⌀	—	4	30	—	44
	nach 30′ Pause	—	—	10	44	—	34
	2 mg Papaverin	—	—	10	28	—	26
8.	Am Hund:						
	Kontrolle	—	120	140	80	130	—
	7 mg Antergan	—	50	80	12	130	—
	5 mg Antergan	—	40	80	—	—	—

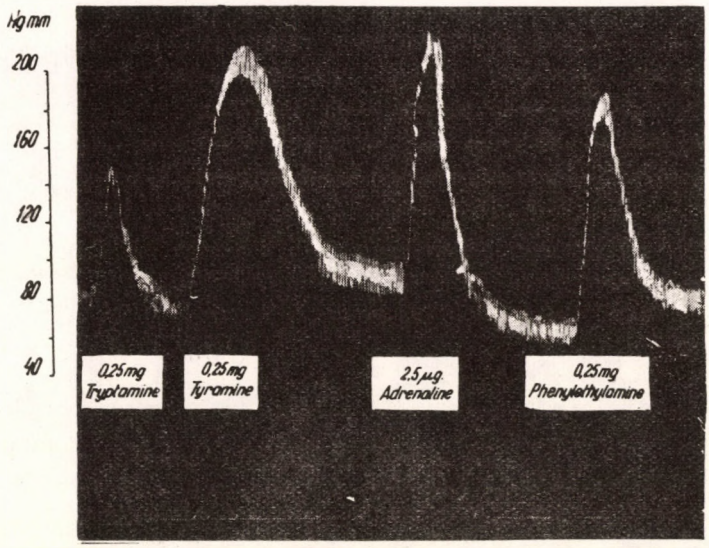
Tryptamin, Tyramin und Phenylaethylamin gegenüber lähmend wirken Tephorin und Trimeton zeigen dem Tryptamin und Tyramin gegenüber gleichfalls eine Hemmwirkung.

Es ist nachweisbar, dass diese, die Amine beeinflussende Lähmwirkung von der Adrenerg-Lähmwirkung unabhängig ist. Es ist nämlich bekannt, dass von den untersuchten Antihistaminen das Pyribenzamin (Dehistin) und das Antergan die Wirkung des Adrenalins in Blutdruckversuchen verstärken (14). Andererseits konnten wir in unseren gegenwärtigen Versuchen (4., 7. Versuch) die Steigerung der Noradrenalinwirkung nach Dehistin- und Trimetonbehandlung feststellen. Die untersuchten Antihistamine wirken wiederum, unabhängig davon, ob sie die Adrenalin- oder Noradrenalinwirkung steigern (z. B. das Dehistin) oder vermindern [z. B. das Tephorin (14)], hemmend auf die untersuchten Amine.

Die dem Tryptamin, Tyramin und Phenylaethylamin gegenüber nachweisbare Lähmwirkung ist mit der Antihistamin-Aktivität nicht proportionell, weil das im allgemeinen als schwächer bekannte Antergan in dieser Hinsicht noch stärker wirkt, wie die bezüglich der Antihistaminwirkung als stärker bekannten Trimeton- oder Tephorinverbindungen.

Wir haben bewiesen, dass das Antergan in einer Dosis von 7 mg/kg nicht nur in der Katze, sondern auch im Hund eine Hemmwirkung auf das Tryptamin ausübt und auch dem später verabfolgten Tyramin und Phenylaethylamin gegenüber lähmend wirkt *(Abb.* 1). Der Grad der Lähmwirkung ist davon abhängig, in welchem Zeitpunkt nach Einführung der lähmenden Substanz die Wirkung der Stoffe geprüft wird. Die beobachtete Lähmwirkung der Antihistamine auf das Tryptamin, Tyramin und Phenylaethylamin hört nämlich in kurzer Zeit auf, während ihre Antihistaminwirkung erhalten bleibt. Dieser Umstand weist ebenfalls darauf hin, dass es sich um zwei verschiedene Wirkungen handelt. Ferner beobachteten wir, dass die Beeinflussbarkeit der blutdrucksteigernden Wirkung der untersuchten Amine auch vom anfänglichen Blutdruck der Tiere abhängig ist. Bei solchen Tieren, deren Blutdruck verhältnissmässig hoch ist, kann z. B. auch die blutdrucksenkende Wirkung des Tyramins beobachtet werden.

Nach Verabfolgung von 1.2 mg Dehistin nahm in einem Versuch die Wirkung des Tryptamins kaum ab, während sich die vom Phenylaethyldiamin umkehrte *(Abb.* 2). Die Tatsache, dass die Wirkung des Phenylaethylamins und Tyramins auch einen vasodilatatorischen Komponenten besitzt, ist aus dem in *Abb.* 3 dargestellten Versuch zu ersehen. An Katzen erzeugt das Tryptamin auf die Wirkung von Adrenalininfusion auch weiterhin eine Blutdruckerhöhung, während das Phenylaethylamin und Tyramin den Blutdruck herabsetzen. Es ist fraglich, inwiefern die beobachtete blutdrucksenkende Wirkung der oben erwähnten Amine mit derselben Wirkung vom Adrenalin und Noradrenalin vergleichbar wäre. Zur Analyse der blutdrucksteigernden



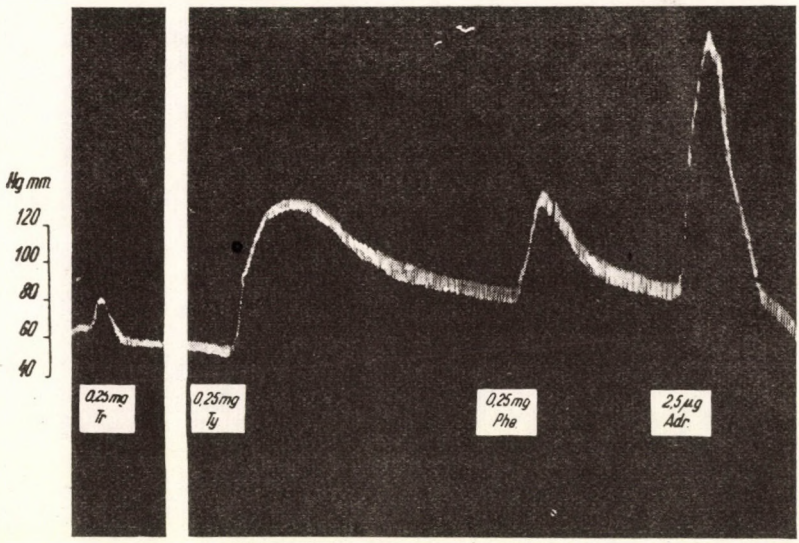


Abb. 1. Blutdruck des Hundes. 8,0 kg Sevenalnarkose. Zeichenerklärung: Tr = Tryptamin; Ty = Tyramin; Phe = Phenylaethylamin; Adr = Adrenalin. Zeitbestimmung: 30". Erster Teil der Abbildung: vor Antergan. Zweiter Teil der Abbildung: nach 7 mg/kg Antergan. Tryptamin zwei Minuten nach Antergan, Tyramin 6 Minuten, Phenylaethylamin 16 Minuten, Adrenalin 20 Minuten nach Antergan.

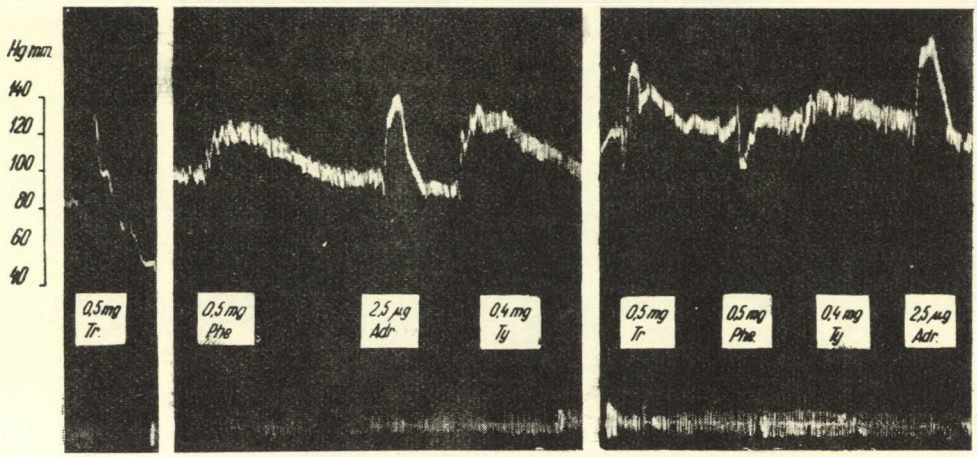


Abb. 2. Blutdruck der Katze. 2,5 kg Pernocton-Urethannarkose. Ersten zwei Teile der Abbildung vor Dehistin. Dritter Teil der Abbildung: nach 1,2 mg/kg Dehistin. Zeichenerklärung: Tr= Tryptamin; Phe=Phenylaethylamin; Adr=Adrenalin; Ty=Tyramin; Unten: Respiration.

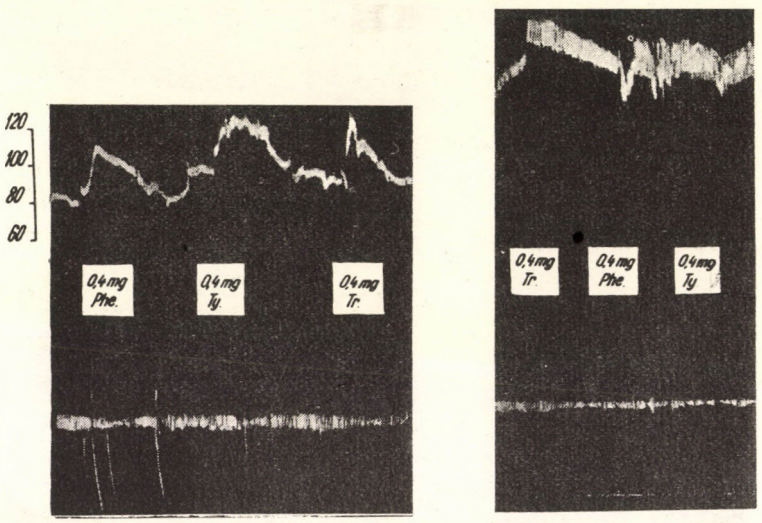


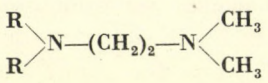
Abb. 3. Blutdruck der Katze. 2,00 kg Pernocton-Urethannarkose. Erster Teil der Abbildung Vor Adrenalininfusion. Zweiter Teil der Abbildung: während Adrenalininfusion vo 12 µ g/min. Zeichenerklärung: Ph›=Phenylaethylamin; Ty=Tyramin; Tr=Tryptamin. Unter Respiration. Zeitbestimmung 30".

Wirkung vom Tryptamin, Tyramin und Phenylaethylamin untersuchten wir das Verhalten dieser Stoffe nach Anwendung des die vegetativen Ganglien lähmenden Hexamethoniums. Es ergab sich, dass durch die Lähmung der Ganglien die blutdrucksteigernde Wirkung der Amine überhaupt nicht herabgesetzt, sondern sogar erhöht wurde.

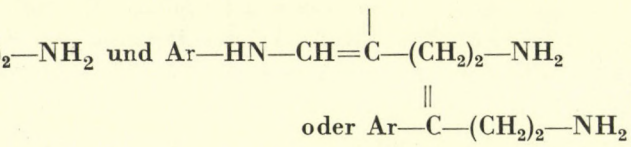
Da ihre Wirkung durch adrenerglähmende Verbindungen nur wenig gehemmt werden kann, ist anzunehmen, dass in den vaskulären Wirkungen vom Tryptamin, Tyramin und Phenylaethylamin die periphere, neurogen bedingte Gefässverengerung keine wesentliche Rolle spielt. Reizung der vegetativen Ganglien (Wirkung auf die Nebenniere) kann ebenfalls ausgeschlossen werden. Dies steht im Gegensatz zu den Angaben, nach denen das Tyramin durch Vermehrung der Adrenalinsekretion oder durch Lähmung der das Adrenalin und Sympathin abbauenden Monoaminooxydase wirkt. Dementsprechend vermochte *Ahlquist* (9) die erwähnte, die Ephedrinwirkung betreffende Hypothese zu widerlegen. Es ist anzunehmen, dass die obigen Amine ihre Wirkung auch durch Reizung der sympathischen vasopressorischen Nervenendigungen entfalten, sei es, dass sie diese unmittelbar oder über das Zentralnervensystem reizen, so, wie es im Falle des Tryptamins behauptet wird (5). Als ihre Hauptwirkung ist eine unmittelbar an der Gefässwand angreifende verengernde Wirkung anzusehen. Diese Wirkung zeigt eine gewisse, von der chemischen Struktur abhängige Spezifizität, da ihre Empfindlichkeit den antihistaminartigen spasmolytischen Mitteln gegenüber grösser ist als gegenüber den allgemeinen Spasmolytika der glatten Muskulatur (Papaverin, Pavatrin, Versuche 2. und 7.). Ausser dieser Wirkung ist auch eine aufs Herz ausgeübte stimulierende Wirkung anzunehmen, die im allgemeinen bei solchen Aminen (z. B. Ephedrin) pharmakologisch schwer gehemmt wird, und zur Ursache der Blutdrucksteigerung werden kann.

Ausser der vasopressorischen Wirkung war bei diesen Aminen in einzelnen Fällen auch eine vasodilatorische Wirkung wahrzunehmen (z. B. nach Dehistin). Möglicherweise spielen auch diese Amine eine solche Rolle, die man bisher nur dem Adrenalin zugeschrieben hat, welches an der Regulation des Blutdruckes auf solche Weise teilnimmt, dass es infolge Reizung der sympathischen vasodilatatorischen Rezeptoren nicht nur eine blutdrucksteigernde, sondern — besonders bei höherem Blutdruck — auch eine druckherabsetzende Wirkung erhält, also bis zu einem gewissen Grade eine druckregulierende Wirkung besitzt [*Goldenberg* (10)]. Es fragt sich aber, ob die von uns untersuchten Amine die beobachtete Vasodilatation durch Reizung der sympathischen, vasodilatatorischen Rezeptoren auslösen. Für diese Wirkung sind nämlich, wenigstens bei den Dioxyphenyl-alkylaminen, Alkylgruppen am Nitrogen der Seitenkette nötig (Adrenalin, Isuprel) (11). Die von uns untersuchten Verbindungen aber, deren Seitenketten eine NH_2 Gruppe enthalten, bedürfen zur Analyse der vasodilatatorischen Wirkung noch weiterer Prüfung.

Die Beobachtung, dass die Antihistamine der chemischen Struktur:

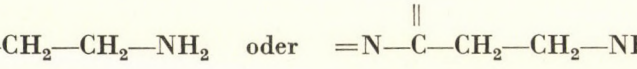


wenn auch kurz wirkende, aber ziemlich aktive Antagonisten der Blutdruckwirkung jener Amine sind, deren Struktur:

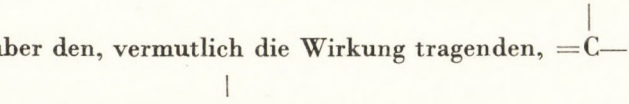


entspricht, macht es erforderlich, dass wir die chemische Struktur auf Grund dieser Beobachtung eingehender studieren. Dafür sprechen, ausser unseren gegenwärtigen Untersuchungen, auch die folgenden Daten. Nach *Buchholz* und seinen Mitarbeitern (8) erstreckt sich die Wirkung der Antihistamine bis zu einem gewissen Grade auch auf die Wirkungen des Tyramins, andererseits sind nach *Lee* und *Jones* (12) histaminähnliche Wirkungen auch mit anderen, eine β-aminoaethyl Gruppe enthaltenden heterozyklischen Derivaten zu erzielen. Nach unseren Untersuchungen kann die blutdrucksteigernde Wirkung des Histamins, die nur bis zu einem gewissen Grade indirekt ist, über die Nebennieren (13) durch Antihistamin gehemmt werden.

Die blutdrucksteigernde Wirkung des Histamins und der untersuchten Amine dürfte demnach bis zu einer gewissen Grenze eine durch die ähnliche Struktur bedingte analoge Wirkung sein, die sich den lähmenden Molekülstrukturen gegenüber identisch verhält. Nach *Lee* und *Jones* (12) sind zur Histaminwirkung solche Verbindungen nötig, welche die Gruppen:

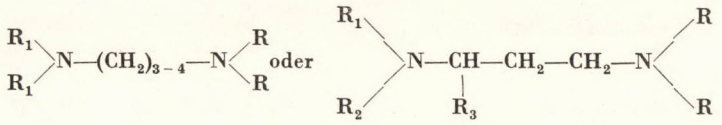


Auf Grund der Analogie der gegenüber diesen Strukturen wirkenden $=N-(CH_2)_2-N=$ Struktur besitzenden Antihistamine sind wir der Meinung,



bezw. $=N-CH=C-CH_2-CH_2-NH_2$ Struktur besitzenden Molekülfragmenten der untersuchten Amine, die Antihistamine obiger Struktur sinngemäss bis zu einer gewissen Grenze wirksam sind. Es wäre natürlich verfehlt, ausschliesslich auf Grund der obigen Formeln zu urteilen, da Ausnahmen in allen solchen Fällen vorkommen können. Immerhin hat es auf Grund der obigen Ausführungen den Anschein, dass die gegenüber der Struktur der untersuchten

Amine antagonisierenden Moleküle fernerhin weniger in den Antihistaminen vom Aethylendiamin Typ als in den zur chemischen Struktur



gehörenden Verbindungen gesucht werden müssen.

Zusammenfassung

Wir untersuchten die Blutdruckwirkungen vom Tryptamin, Tyramin und Phenylaethylamin in Blutdruckversuchen an der Katze.

Von den antihistaminartig wirkenden Stoffen vermindern Dehistin (Pyribenzamin) und Antergan, sowie Tephorin und Trimeton die blutdrucksteigernde Wirkung der obigen Amine.

Die Hauptwirkung vom Tryptamin, Tyramin und Phenylaethylamin besteht in einer unmittelbaren Gefässverengerung, die auf Adrenerg-Lähmungsstoffe wenig reagiert. Ausser ihrer blutdrucksteigernden Wirkung ist auch eine vasodilatatorische Wirkung nachweisbar.

Auf Grund der Ergebnisse kann man bei der Synthese, der die Wirkung obiger Amine hemmenden neuen Verbindungen, auch von der Struktur der Antihistamine ausgehen.

LITERATUR

1. *Rapport, M. M.:* J. Biol. Chem. **180,** 961 (1940).
2. *Freyburger, W. A. Soc.:* J. Pharmacol. **105,** 80 (1952).
3. *Page, I. H.:* J. Pharmacol. **105,** 58 (1952).
4. *Reid, G.:* Austr. J. exp. Biol. and Med. Sci. **101,** 2912 (1951).
5. *Guggenheim:* Die Biogenen Amine (Karger, Basel 1950.) p. 592.
6. *Wooley, D. M.:* J. Am. Chem. Soc. **74,** 2948 (1952).
7. *Espamer, V.:* Nature **170,** 281 (1952).
8. *Buccholz, R., Hahn, F., Plester, D.:* Arch. exp. Path. u. Pharm. **212,** 189 (1951).
9. *Ahlquist, R. P.:* J. Am. Pharm. Ass. (Sci. Ed.) **38,** 1 (1949).
10. *Goldenberg, M., Soc.:* Am. J. Med. **5,** 792 (1948).
11. *Lands, A. M.:* J. Pharmacol. **96,** II, 279 (1949).
12. *Lee, H. M., Jones, G. R.:* J. Pharmacol. **95,** 71 (1949).
13. *Gyermek, L., Sztanyik, L.:* Kisérletes Orvostud. **4,** 241 (1952).
14. *Loew, E. R.:* Ann. New York Acad. Sci. **50,** 1142 (1950).

ДАННЫЕ К ФАРМАКОЛОГИИ ТРИПТАМИНА, ТИРАМИНА И ФЕНИЛЭТИЛАМИНА

Л. Дьермек

Фармакологический исследовательский институт, Будапешт.

Резюме

Авторами было исследовано влияние триптамина, тирамина и фенилэтиламина на кровяное давление, в опытах по кровяному давлению над кошками.

Из веществ антигистаминового действия, Дегистин (пирибензамин) и Антерган, также как и Тефорин и Триметон снижают повышающее кровяное давление действие названных аминов.

Основным действием триптамина, тирамина и фенилэтиламина является непосредственное сосудосуживающее действие, мало реагирующее на адренерг-парализирующие вещества. Наряду с их повышающем кровяное давление действием можно выявить и сосудорасширяющее действие.

На основе вышеприведенных результатов, при синтезе новых соединений, тормозящих действие упомянутых аминов, можно исходить и из строения антигистаминов.

STUDIES ON CHOLINERGIC BLOCKING SUBSTANCES IV.

CORRELATION BETWEEN STRUCTURE AND EFFECT OF QUATERNARY DERIVATIVES OF BENZOYLTROPINE AND BENZOYL Ψ TROPINE COMPOUNDS

By

L. GYERMEK

PHARMACO-INDUSTRIAL RESEARCH INSTITUTE, BUDAPEST

(Received, September 24, 1952)

Earlier investigations have revealed that the pharmacological properties of different quaternary tropeines undergo marked changes, depending on the quaternary groups (1, 2). In the search for tropeines of curarine action (3), on the one hand, and for ganglion blocking tropeines on the other, one of the greatest difficulties presenting itself was the untoward parasympathetic blocking side effect (2). *Nádor* and *Issekutz* (3, 4), starting from benzoyltropine, a substance with a marked local anaesthetic, but a very weak anticholinergic action, succeeded in obtaining compounds of high curarine activity without side effects. The undesirable cholinergic blocking effect can be eliminated also by means of producing aralkylquaternaries instead of the methylquaternaries of tropeines (5). In this way tropeines of a very marked antinicotine action but with a very moderate antimuscarine effect have been obtained. Thus the aralkyl derivatives possess only a fraction of the antimuscarine effect of the basic compound. The local anaesthetic effect, of quaternary derivatives prepared from tropeines possessing a local anaesthetic action, has not been studied so far. For this reason, it appeared important to subject to more detailed investigation the correlations existing between structure and effect of the different tropeines of local anaesthetic action. The role played by different quaternary groups, as well as the behaviour of tropeines differing from each other in stereostructure, have been studied in detail. For stereostructural studies, benzoyltropine and benzoyl ψ tropine (tropacocaine), both possessing a local anaesthetic effect, proved to be the compounds easiest accessible. For more detailed stereostructural studies, quaternary derivatives of benzoic acid esters of tropine and pseudotropine were pepared. These compounds have been studied in the first place for different anticholinergic (antimuscarine, antinicotine) actions. It seemed also interesting to study the development of the local anaesthetic action and its eventual alterations in the case of different compounds.

Methods

The usual and previously described (1, 2) methods were used for studying anticholinergic effects. Antimuscarine action was studied in the cat, by means of blood pressure and isolated intestine experiments. Cat blood pressure and nictitating membrane experiments, as well as

the effect against spasms induced by nicotine on the intestine of the rabbit were used for determining the action exerted on ganglionic synapses. The curarine action was studied in the frog, by administering substances into the lymph sac. The local anaesthetic action was studied by two methods. One of them was our method of infiltration anaesthesia[6], the other the frog plexus anaesthesia, which was used for determination of the conduction anaesthetic effect[7].

The compounds studied were produced from tropacocaine (Merck) and from benzoyltropine (Chinoin) by means of bringing them into reaction with the corresponding alkylhalogenides, as it had been done in the case of other tropeines earlier produced(5). Halogen and nitrogen analysis, as well as melting point determinations were used for identifying the various compounds.

Results

The results concerning different effects are shown in the Table.

It can be seen that as far as antimuscarine action is concerned, benzoyltropine and its quaternary derivatives proved to be more effective than benzoyl ψ tropine derivatives. In the tropine molecule the OH group is in the anti position, while in pseudotropine it occupies the syn position, as it has been reported by *Fodor* and *Nádor* (8, 9). In the benzoyltropine molecule, benzoic acid is attached to the OH group in the trans (i. e. anti) position. It has been found that this benzoic acid ester group, being relatively far from the nitrogen atom in the nucleus of the tropine ring, is more likely to give rise to a blocking action at parasympathetic nerve endings, than the benzoic acid esters contained in tropacocaine (benzoic acid ester of pseudotropine) and its derivatives, where the ester group is relatively nearer to the nitrogen in the tropine ring. The parasympathetic blocking action is not uniformly influenced by the different quaternary groups in the benzoyltropine and benzoyl ψ tropine series.

While the methyl, ethyl and propyl quaternaries of antitropine derivatives proved to be more potent parasympathetic blocking substances than the tertiary basic compound and butyl and benzyl quaternaries, no such differences worth consideration could be found between the different quaternaries of the syntropine series. According to the theory of *Pfeiffer* (10), the molecular structure needed for antimuscarinic effect requires a tertiary or quaternary nitrogen group containing a methyl group, as well as 2 atoms of oxygen, one at a distance of 5 Å, the other at 7 Å, from the nitrogen-methyl group. If the oxygen groups mentioned are important factors in the antimuscarinic effect, it appears that the distance required is present only in antitropines and not in the esters of the syn-tropine. It is, however, questionable whether *Hirschfelder*'s model for the calculation of atomic distance, as used by *Pfeiffer*, would be applicable to tropeines of different stereostructure. It appears that as regards parasympathetic blocking action, the effectiveness of a group of compounds is already determined by the anti form of tropine and no quaternary group is capable of influencing this in syn compounds in which the stereostructural form probably does not permit the O_2 groups to be at the required distance of 5 Å, resp. 7 Å, from the nitrogen of the tropine.

While they have a very little effect on parasympathetic nerve endings, the majority of compounds exerts a marked anticholinergic action at the other site of acethylcholinic action, on vegetative ganglia. Similarly to all known ganglion blocking quaternary derivatives, these compounds also exert a blocking action on both sympathetic and parasympathetic ganglia *(Fig. 1)*. For instance,

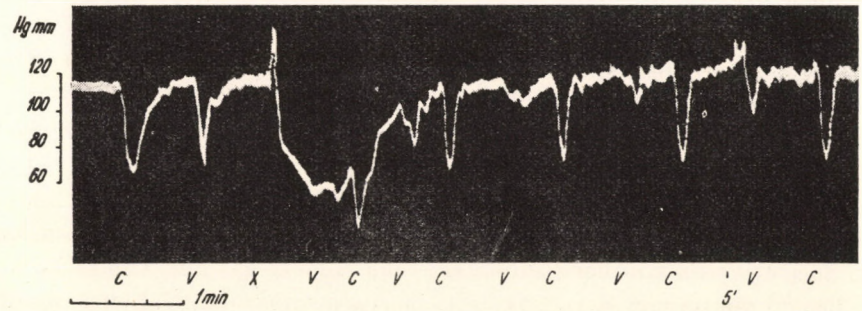


Fig. 1. Blood pressure of cat. Pernoctone-Urethane narcosis. Time, 1 minute. C : Carbaminocholine 0,5. g. V: Stimulation of peripheral vagal stump for 15 secs. Slide inductor coil distance, 11 cm. X : 0,25 mg/kg of ethyl-(benzoyl-syn-tropinium)bromide. 5' : Five minutes interval

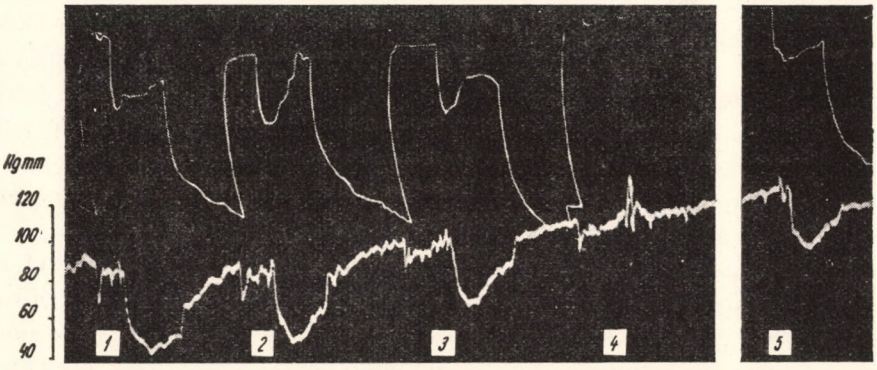


Fig. 2. Blood pressure and nictitating membrane of cat. Pernoctone-Urethane anaesthesia. 1 : 0,2 mg/kg of n-propyl (benzoyl-syn-tropinium) bromide. 2 : 0,2 mg/kg of ethyl (benzoyl-syne tropinium) bromide. 3 : 0,2 mg/kg of n-butyl (benzoyl-syn-tropinium) bromide. 4 : 0,4 mg/k- of methyl (benzoyl-syn-tropinium) iodide. 5 : 1,0 mg/kg of tetraethylammonium bromide.

a 0,25 mg/kg dose of ethyl benzoyl syn-tropinium bromide has no blocking effect on parasympathetic nerve endings and is ineffective against carbaminocholine. It inhibits, however, in consequence of blocking parasympathetic ganglia, vagal stimulation productive of similar effects. In nictitating membrane experiments such a dose blocks also the superior cervical ganglion (*Fig. 2*), indicating that sympathetic ganglia are also blocked by the compound. As regards the ganglion blocking effect, members of the benzoyl syn-tropinium series are not less

effective than the anti-tropine derivatives, in contrast to what was stated in connection with parasympathetic blocking effects. This illustrated by the fact that while methyl benzoyl syn-tropinium bromide has little effect as a ganglion blocking agent, the marked ganglion blocking effect of the ethyl, propyl and butyl quaternaries is even stronger than that of the corresponding members of the anti series. Interesting observations could be made in connection with the first two members of the syn-tropine series. Methyl benzoyl syn-tropinium shows a marked, ethyl benzoyl syn-tropinium compound only a mild nicotine stimulating effect in addition to the actions discussed, while no such effect was exerted by the corresponding anti derivatives.

Thus it can be stated that ganglionic actions do not depend so much on the anti form than the effect on parasympathetic nerve endings. An affinity to the receptors in vegetative ganglia is shown by most members of each series. They mostly produce inhibition, with the exception of the above mentioned methyl derivative that rather stimulates than blocks ganglia. The role played by the benzyl quaternary derivative also merits attention. Experience obtained with simple quaternary derivatives has shown (11) that as far as the effect on the synapsis is concerned, the benzyl groups take over the function of the ethyl, or even more that of the methyl groups. As regards ganglionic action, this observation appears to be valid also in the case of the above compounds. Similarly to methyl benzoyl syn-tropinium iodide, the ganglion blocking effect of the benzyl derivative is also very weak, thus showing no resemblance to higher quaternaries. The ganglion stimulating effect is, of course, terminated with the benzyl derivatives. As it is known, for obtaining cholinergic stimulation, whether at the parasympathetic nerve endings or in vegetative ganglia, alkylammonium compounds in which the majority of alkyl groups is represented by methyls (e. g. acetylcholine, tetramethylammonium, Prostigmine) are required, in general.

As regards the blocking of ganglionic synapses, the methyl and benzyl quaternaries of benzoyl syn-tropine were found the least effective compounds, also at myoneural synapses. Concerning their curarine effect, from among the syn-tropeine compounds the methyl and benzyl quaternary derivatives exhibited the weakest action (see Table). The most active from among the syn and anti tropine derivatives were the butylquaternary compounds, which are also potent ganglion blocking agents. Our earlier theory (1), according to which the curarine and ganglion blocking effects of the different monoquaternary derivatives run, to a certain extent, parallel with each other within a group of compounds, could be confirmed in experiments carried out with the above compounds. With bisquaternary ammonium compounds the situation appears to be reversed.

As to the local anaesthetic effect, it has been found that the efficacy of methylquaternary compounds is much inferior to that of the tertiary basic compounds. Thus, e. g. methyl (benzoyl anti-tropinium) iodide is about 2,5 times

less effective as a local anaesthetic than benzoyl (anti-tropine) HCl. Similarly, methyl (benzoyl syn-tropinium) iodide is 8 times less potent in infiltration anaesthesia and about 6 times less effective in conduction anaesthesia than the tertiary compound. The properties of higher alkyl and aralkyl quaternaries are, however, strikingly different. For instance, ethyl and benzyl (benzoyl tropinium) bromides, as well as butyl, isoamyl and benzyl syn-tropinium halogenides show an activity approximating or equalling that of tertiary compounds (See Table). Members of the syn-tropinium series increase their infiltration and conduction anaesthetic activity in direct proportion with the increase of quaternary groups. No such proportional correlation could be detected in the anti tropine series. In conduction anaesthesia, higher aralkyl quaternaries are even more effective than tertiary compounds.

TABLE I

	1	2	3	4	5
Benzoyltropine HCl ...	1/100	0,1	∅	1,5	—
CH_3J ...	1/40	2,1	0,15	0,6	—
C_2H_5Br	1/50	3,0	0,25	1,4	—
n-C_3H_7Br	1/50	2,8	0,10	1,2	—
n-C_4H_9Br	1/200	6,0	0,25	0,6	—
benzylBr	1/100	3,0	0,10	1,2	—
Benzoyl ψ Tropine HCl	1/300	0,1	∅	2,2	2,6
CH_3J	1/500	0,2	0,06	0,25	0,4
C_2H_5Br	1/200	6,7	0,15	0,58	2,8
n-C_3H_7Br	1/300	6,0	0,10	0,80	3,0
n-C_4H_9Br	1,200	4,6	0,25	1,50	3,2
i-$C_5H_{11}Br$	1/300	2,8	0,20	1,55	4,3
benzyl Br	1/200	0,5	0,10	2,20	2,0

1. Antimuscarinic effect on isolated cat and guinea pig intestine. Atropine=1,0.
2. Ganglionic blocking effect on nictitating membrane of the cat. TEA=1,0.
3. Curariform effect in the frog. d-tubocurarine=1,0.
4. Infiltration anaesthetic effect, abdominal skin of rat[4]. Procaine=1,0.
5. Conduction anaesthetic effect (frog plexus anaesthesia). Procaine=1,0.

Nevertheless, much care is indicated in the quantitative evaluation of that effect. The method of frog plexus anaesthesia was developed for studying the motor response and it may be supposed that the blocking of motor nerve endings might lead to misleading results in experimental methods based on the motor response.

The curarine effect is one of the characteristic features of quaternary ammo nium compounds. In spite of this, higher alkyl and aralkyl derivatives of tropeine with a local anaesthesic action, proved to possess a marked local anaestheti effect.

This could be shown also by methods in which the disturbing curarine effec could be eliminated. (Investigation of infiltration anaesthetic action.) It rem ains to be solved, whether the high activity in conduction anaesthesia of highe alkyl quaternaries is due exclusively to their local anaesthetic action or does a slight curarine action also play a part in this effect. This combined action ma be responsible for the higher activity of derivatives.

According to the view generally accepted local anaesthetics containin tertiary nitrogen lose their local anaesthetic effect when quaternarized. Accor ding to *Ing*, *Dawes* and *Wajda* (12), the local anaesthetic effect is the characteris tic feature of the tertiary base and not that of the onium kation. Although a vas number of local anaesthetics have been produced, no quaternary ammonium compounds (13, 14) have been mentioned in the literature.

For the completion of our results the local anaesthetic effect of kon vocaine (15) and that of its α-naphtylmethyl derivative has also been studied It has been found that quaternarizing with aralkyl did not lead to reduc tion in the local anaesthetic activity in the case of these compounds either.

It follows from the experiments that, in addition to compounds contain ing secondary or tertiary amino groups, also certain quaternary ammonium derivatives may be classified into the group of local anaesthetic amines. Com pounds containing onium kation differ in pharmacological properties from secondary and tertier amines and therefore it might be assumed that they will allow to obtain anaesthetic compounds differing in properties and applicability from those hitherto known.

Certain bisquaternary compounds produced or examined by us exert both a curarine and a local anaesthetic effect (16). It is hoped that further work will lead to the discovery of compounds in which the local anaesthetic and curariform effects are optimally united within one molecule and thus a substance needed in surgical practice will be made available.

Summary

The cholinergic blocking and local anaesthetic actions of benzoyltropine (benzoyl antitropine) and of benzoyl ψ tropine (benzoyl syn tropine) were studied, with special reference to changes of stereostructure.

Alkylquaternary derivatives of the above tropeines (C = 1 — 4) possess a very weak parasympathetic blocking effect. Many of them were found to be

very active at ganglionic synapses. A less intensive blocking action was exerted upon motor nerve endings.

Certain alkyl and aralkyl quaternary derivatives possess a marked local anaesthetic effect. In infiltration anaesthesia the activity of these comporids is equal to, while in conduction anaesthesia higher than that of tertiary basic compounds. Marked reduction in the local anaesthetic effect occurred in the case of methylquaternaries only.

LITERATURE

1. *Gyermek, L.* and *Nádor, K.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 183 (1952).
2. *Gyermek, L.* and *Nádor, K.:* Kísérletes Orvostud. **4**, 212 (1952).
3. *Nádor, K., Issekutz, K., L.* and *Kovatsits, M.:* Magy. Kémiai Folyóirat **56**, 440 (1950).
4. *Issekutz, B. Sen.:* Arch. exp. Path. u. Pharm. **215**, 283 (1952).
5. *Nádor, K.* and *Gyermek, L.:* Magy. Kémiai Folyóirat **57**, 349 (1951).
6. *Gyermek, L.:* Arch. int. Pharmacodyn. 91, 366 (1952). Kísérletes Orvostud. (1952.)
7. *Bülbring, E.* and *Wajda, J.:* J. Pharmacol. **85**, 78 (1945).
8. *Fodor, G.* and *Nádor, K.:* Nature **169**, 462 (1952).
9. *Fodor, G.:* Ibid. **170**, 278 (1952).
10. *Pfeiffer, C. C.:* Science, **107**, 94 (1948).
11. *Nádor, K.* and *Gyermek, L.:* Acta Chimica 2, (1952). In Press.
12. *Ing, H. R., Dawes, G.* and *Wajda, J.:* J. Pharmacol. **85**, 85 (1945).
13. *Suter, C. M.:* Medicinal Chemistry. John Viley and Sons, (1951). Chapt.4. Carney, T. P.: Benzoates and Substituted Benzoates as Local Anaesthetics.
14. *Büchi, J.:* Arzneim. Forsch. **2**, 65 (1952).
15. *Rabinovics, M. Sz.:* Мед-промышл. СССР **3**, 37 (1949). cit. Gyógyszerész, 187 (1950).
16. *Gyermek, L.:* Unpublished.

The author is greatly indebted to *Dr. K. Nádor* for generous supplies of benzoyltropine benzyl bromide, benzoyl ψ tropine benzyl-bromide, and p-aminobenzoyltropine α-naphtylmethylchloride compounds for the experiments, as well as to Miss Zs. *Csák* and Mr. Zs. *Csizmadia* for much help with some parts of the experimental work.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЕЩЕСТВ, ПАРАЛИЗИРУЮЩИХ ХОЛИНЕРГИЧЕСКУЮ СИСТЕМУ. IV. СВЯЗЬ МЕЖДУ ХИМИЧЕСКИМ СТРОЕНИЕМ И ДЕЙСТВИЕМ У ЧЕТВЕРТИЧНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ БЕНЗОЛ-ТРОПИН И БЕНЗОИЛ Ψ ТРОПИН

Л. Дьермек

Фармакологический институт медицинского университета, г. Будапешт

Резюме

Автор исследовал четвертичные производные бензоилтропина (бензоил антитропин) и бензоил Ψ тропина (бензоил-син-тропина) с точки зрения холинерг-парализирующего действия, а также и местно-анестезирующего действия, с особым учетом изменений пространственного строения.

STUDIES ON CHOLINERGIC BLOCKING SUBSTANCES V.

THE PHARMACOLOGY OF MONOQUATERNARY TROPEINES ACTING ON VEGETATIVE GANGLIA

By

L. GYERMEK and K. NÁDOR

INSTITUTE OF PHARMACOLOGY OF THE MEDICAL UNIVERSITY AND PHARMACO-INDUSTRIAL RESEARCH INSTITUTE, BUDAPEST

(Received, November 28, 1952.)

It has been shown previously (1, 2) that the methylquaternary derivatives of tropeines belonging to the atropine group exert a marked blocking action on autonomic ganglia. It has also been reported that the tropine proper also possesses similar effects (3). The conversion into tropine esters substantially increases the originally weak ganglion blocking effect of alkyl tropinium halogenides. In the search for compounds acting primarily on autonomic ganglia, tropine esters have been chosen for the production of various quaternary derivatives. Comparative pharmacological studies on mono- and bisquaternary ammonium compounds have shown (4, 5, 6, 7) that, in general, compounds of monoquaternary structure act at the ganglia, while the appropriate bisquaternary derivatives are active at the myoneural junction. This observation is valid also for the tropines. (7, 8). Therefore monoquaternary tropeines have been selected for preparing ganglion blocking agents. In the attempt to obtain tropeines of such action the molecular structure was modified in two ways, by introduction of different quaternary groups and by esterification with different acids and studying the role played by the different acid groups. It has been reported (2, 7, 9) that the parasympathicolytic, ganglion blocking, curarine and local anaesthetic effects can be altered separately and individually by changing the chemical structure. In the present study, selection and preparation of compounds was based in the first place on the observation that quaternarizing with the appropriate aralkyl group results in decreasing the parasympathicolytic and increasing the synaptic blocking effects (10,11,7,10), and that not only the mainly parasympathicolytic tropeines containing oxyaromatic acid are potent ganglion blocking compounds, but such an action is exhibited also by other tropeine esters containing aromatic acid.

Methods

Cat nictitating membrane experiments involving the upper cervical ganglion were made in the first place for the estimation of the pharmacological properties of compounds, according to the method previously described (8). In a few instances the ganglion blocking effects have been studied also in cats and dogs, testing the substances against the rise in blood pressure induced by splanchnic stimulation by means of a slide inductor or by the administration of ganglion

stimulants (carbaminoylcholine, nicotine). The activity of compounds was compared with that of TEA, of which doses of 0,25 to 1,5 mg/kg were administered in the nictitating membrane experiments, while in blood pressure experiments the dose of tetraethalammonium bromide varied between 2 and 10 mg/kg, using the intravenous route of administration. Then the equipotent dose of the test substance was determined. The effect on parasympathetic ganglia was studied in isolated intestine experiments (guinea pigs or rabbits), against nicotine spasm. In the case of guinea pig ileum, nicotine was used in a concentration of $2{,}10^{-6}$, while in rabbit intestine experiments the concentration varied between $5{,}10^{-6}$ and $2{,}10^{-5}$. The blocking substances were given 30 seconds prior to the administration of nicotine. The effect on parasympathetic ganglia of compounds exhibiting no appreciable parasympathicolytic (antimuscarine) action was examined in blood pressure experiments in cats or dogs, against the fall of blood pressure and bradycardia induced by vagal stimulation. Here too, the activity was compared with that of TEA or hexamethonium and the dose of the test substance causing a similar block was determined. Of the side effects, action on neuromuscular junctions (curare-like) effect were studied in frog experiments, while the parasympathicolytic action was estimated in cat blood pressure and in isolated intestine experiments, by the method described (8).

Experimental

To facilitate evaluation, the results were summarized in comparative Tables, in which the serial number, the chemical structure of the compounds, as well as their effects on neuromuscular junctions, on ganglia and on parasympathetic nerve endings are presented. The compounds are grouped according to chemical structure in the Tables. More thoroughly examined compounds are discussed also in the text. A report on the synthesis of the compounds will be published in the Acta Chimica Hung.

In the case of *ganglion blocking action* the first column in the Tables shows the ganglion blocking effect exerted on the superior cervical ganglion, with individual figures representing the mean of at least 3 experiments. The activity related to TEA is given as the ratio of doses productive of similar effects, and, in the case of certain compounds, also in the terms of the equipotent molar ratio (*Fig.* 1).

The second column contains the activity against the rise of blood pressure induced by splanchnic stimulation or by ganglion stimulants. Here again the effect is compared with that of TEA and with consideration to intensity and duration of action, the relative activity is given (*Fig. 2*).

In the third column, activity against the fall of blood pressure and bradycardia due to vagal stimulation in the cat or dog is shown. In the case of weak antimuscarine agents, the blocking effects give information on the parasympathicolytic action at parasympathetic ganglia. (Table VI).

The antinicotine effect is only to a certain degree identical with the ganglion blocking action. Since by this method the activity of TEA is slight and cannot be estimated with accuracy, in this instance the activity of the compounds was compared to that of atropine.

Information on neuromuscular blocking action is given in terms of activity related to that of d-tubocurarine, of which 5 mg/kg is considered to be the dose causing complete paralysis.

Parasympathetic blocking effects were studied by the usual methods in cat blood pressure, as well as in isolated intestine experiments in the guinea pig, rabbit

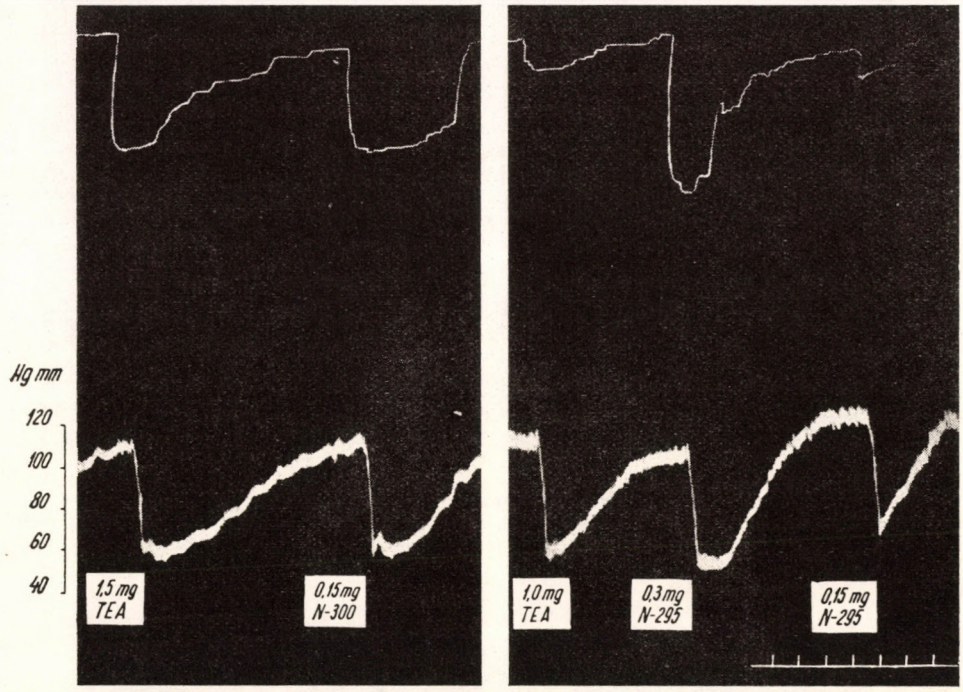


Fig. 1. Cat under Pernoctone-Urethane. Nictitating membrane and blood pressure. Time marker, 60 seconds

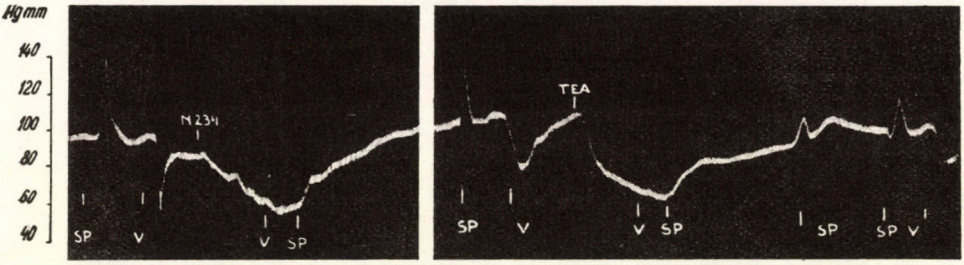


Fig. 2. Cat. Pernoctone-Urethane. V=Vagal stimulation through slide inductor, coil distance 10,5 cm 30". Sp=Stimulation of the splanchnic nerve through slide inductor. Coil distance 10,5 cm, for 30". TEA = 7,0 mg/kg of tetraethylammonium bromide. N-234 = 1,0 mg/kg of N-234

and the rat. The star indicates that not an antimuscarine, but a muscarine effect was exhibited by the compound.

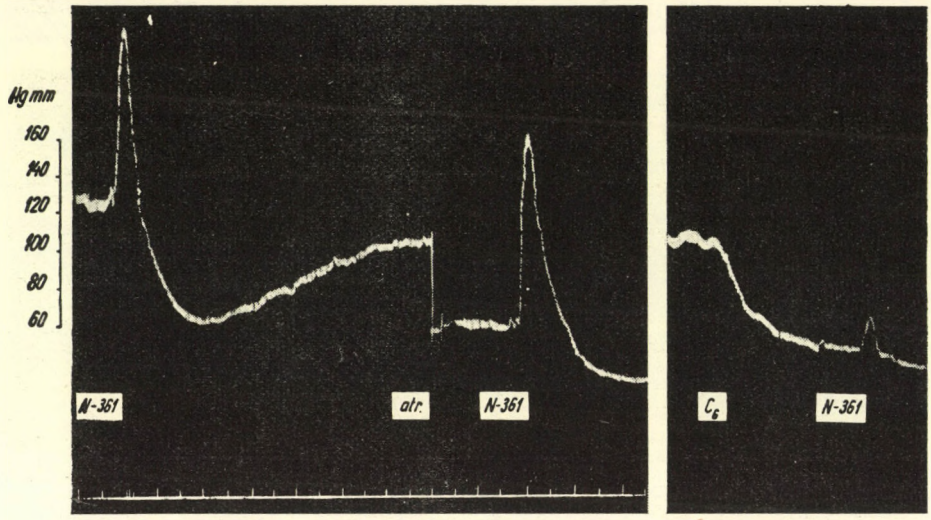


Fig. 3. Cat, blood pressure. Ganglionic stimulant action of N-361 4-phenylbenzyl-(benzoyl-trans-tropinium)bromide. N-361 = 50 μ g/kg of N-361. atr. = 1 mg/kg of atropine. C_6 = 0,5 mg/kg of hexamethonium bromide. Time marker, 30 seconds

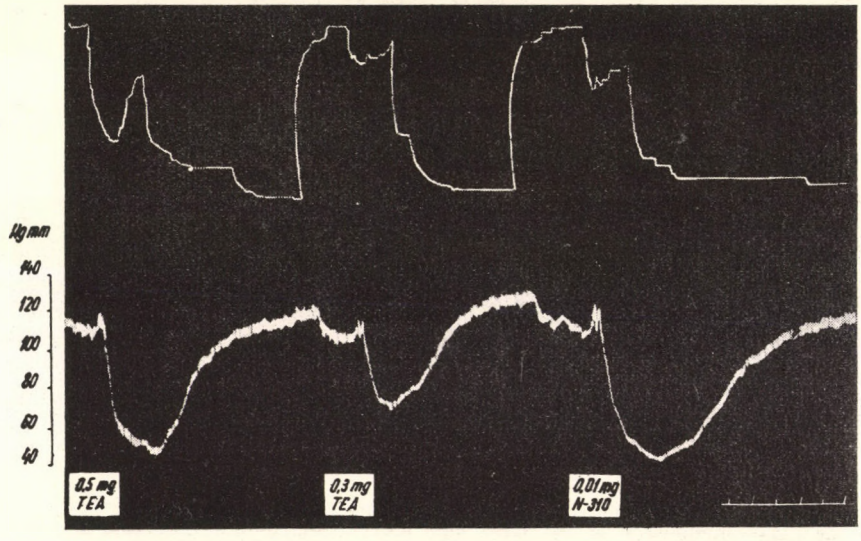


Fig. 4. Cat, Pernoctone-Urethane. Effect of N-310 on blood pressure and contractions of the nictitating membrane, as compared to the effect of TEA. Time marker, 30 seconds

As regards toxicity, the approximate DL_{50} for mice was determined for a few compounds, using the intraperitoneal route. Minimal lethal doses for rats (intravenously) are shown in the last column.

As it can be seen, the methylquaternaries of acetyl and dimethylcarbaminoyl tropine (N-180, N-277) exert very little action on the superior cervical

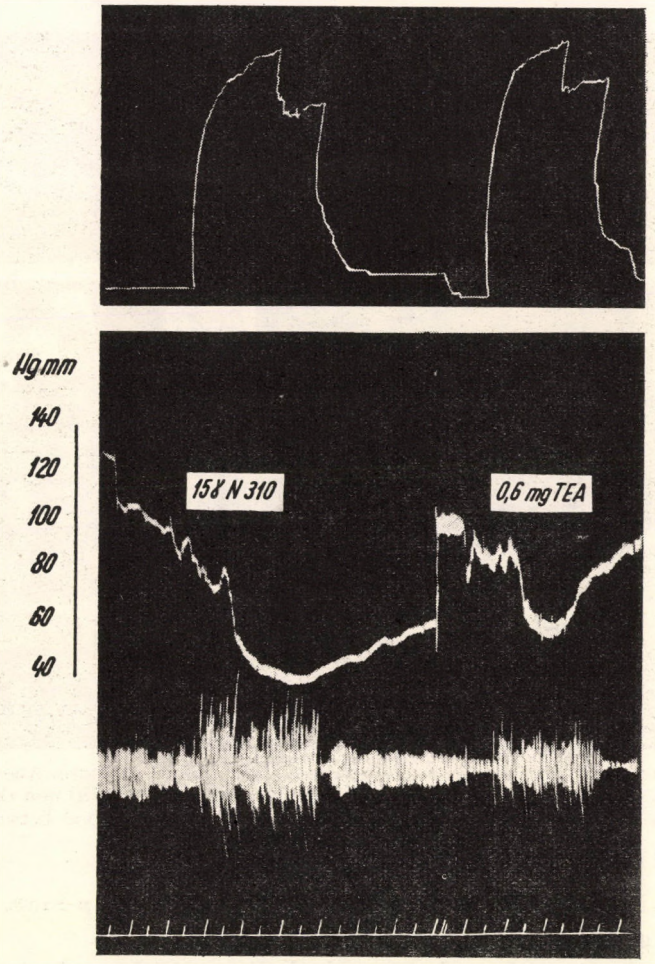


Fig. 5/a. Cat. Pernoctona-Urethane, Below, respiration. Middle, blood pressure. Above nictitating membrane

ganglion ; their curarine action is also very weak. In cat blood pressure and in rabbit intestine experiments these compounds exhibit a marked muscarinic effect, producing a fall of blood pressure, resp. an intestinal spasm that can be relieved by atropine. Their muscarinic effect is 100 to 500 times weaker than that of acetylcholine. On the other hand, the aralkyl quaternaries of the aliphatic acid

tropeines possess more intensive ganglion blocking and curarine effects. The benzylquaternary of acetyltropine is a very weak muscarinic agent. The benzylquaternary of dimethylcarbaminoyltropine exhibits a very weak antimuscarine effect.

Of the aromatic acid tropeines, the different quaternaries of benzoyltropine are, in general, potent ganglion blocking substances. Weakest of them is the

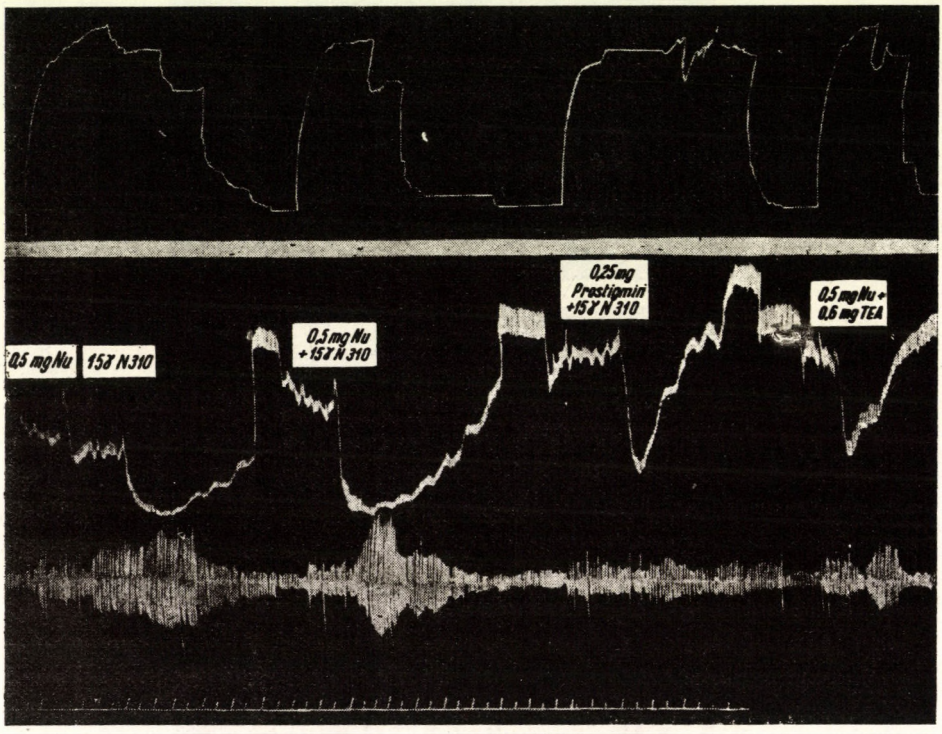


Fig. 5/b. Cat, Pernoctone-Urethane. Below, respiration. Middle, blood pressure. Above, nictitating membrane. Effect of m-oxyphenyl-trimethylammonium iodide (symbol Nu) and that of prostigmine on responses elicited by N-310 and TEA. Five to ten minutes interval between individual effects. Time marker, 30 seconds

methyl derivative. Introduction of the aralkyl group and the p-brom substituent of the aralkyl group increase the activity of the compounds.

These derivatives showed no marked difference in curarine effect. In contrast to anti-tropeines, two syn-tropine derivatives N-293 and N-294 (13) proved to be less active at both ganglionic and neuromuscular synapses. The antimuscarine effect of every benzoyltropine derivative is weak and that of aralkylquaternaries (N-220, N-361) even weaker.

The behaviour of compounds N-293 and N-361 was very interesting. While other tropeines belonging to the series discussed here were particularly

rong ganglion blocking agents, these two compounds exhibited a stimulant ffect on ganglia. While the methyl (benzoyl-syn-tropinium) iodide (N-293) as a relatively weak ganglionic stimulant, compound N-361 = 4 phenylbenzyl-benzoyl-trans-tropinium)bromide was very active in this respect *(Fig. 3)*.

It is well illustrated by the above two examples that the two factors of hemical structure, the quaternary group and the ester group attached to the

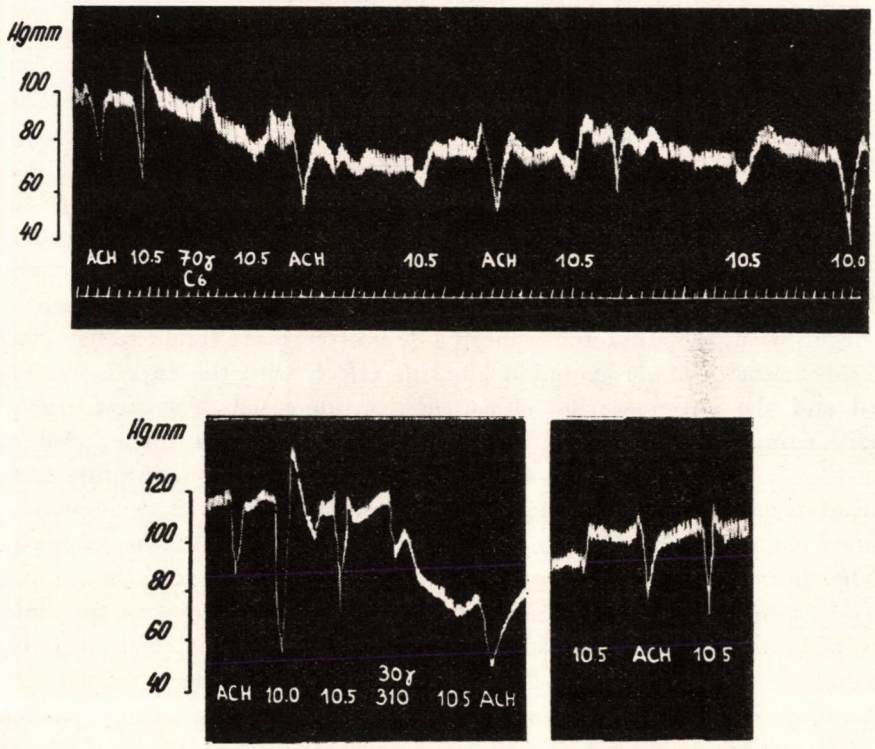


Fig. 6. Cat, Pernoctone-Uretane. Blood pressure. ACH. : 1 μ g/kg of acetylcholine. 10,0, 10,5 : Vagal stimulation for 30", with slide inductor. Coil distance, 10,0 and 10,5 cm 310 : 30 μ g/kg of N-310. C_6, : 70 μ g/kg of hexamethonium bromide

OH group of different stereostructure may interact to bring about far-reaching alterations in the pharmacological properties of the compounds (9, 14).

Substituion on the benzoic acid group strengthens the ganglion blocking effect. The derivatives of p-aminobenzoyltropine are particularly potent ganglion blocking agents, equally effective at both sympathetic and parasympathetic ganglia (for instance, compounds N-234, 266). Both the ganglion blocking and curarine effects increase in direct proportion with the introduction of various aralkyl groups also in this case.

To this group belongs one of our most active synapsis blocking compounds, compound N-266 (p-chlorbenzyl-p-aminobenzoyltropinium-bromide). It is about 20 times as active as TEA ; in molar terms, it is about 48 times as effective. Of its side effects, the antimuscarine action is very weak, while the curarine, action is marked. Therefore the compound is highly toxic. The approximate DL_5^0 for mice is 35 mg/kg, the minimal DL for rat 2,5 mg/kg, intravenously. 5 mg/kg kills the cat. Death is due to respiratory arrest resulting from the paralysis of skeletal muscles followed by paralysis of the diaphragm.

Compound N-261, p-nitrobenzoyltropine p-chlorbenzyl bromide, proved to be a considerably less potent agent. The p-chlorbenzoyl analogon (N-284) was not more active than the appropriate benzoyltropine compound (N-220).

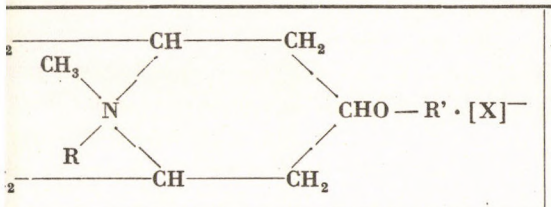
Some correlations between the structure and effect of mandelyltropine derivatives are shown in Table II. We selected mandelyltropine, because it has been found to be the most effective on ganglionic synapses from among the methylquaternaries previously tested (2), and while it possessed a curarine effect relatively weaker than that of other aromatic compounds.

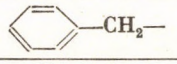
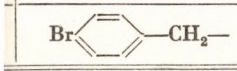
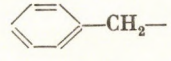
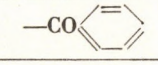
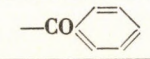
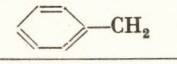
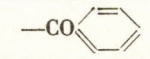
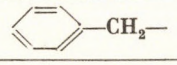
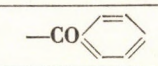
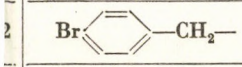
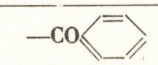
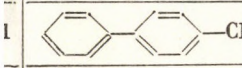
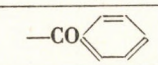
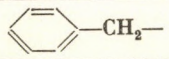
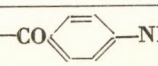
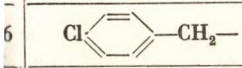
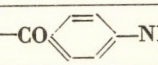
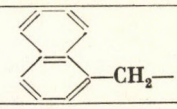
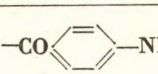
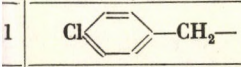
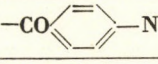
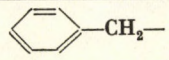
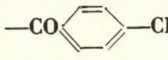
18 derivatives have been prepared. As compared to the methylquaternary we had begun with, the ethyl and isopropyl derivatives were found to have lost some of the intensity of the ganglion blocking effect, with the curarine action unaltered and the antimuscarine effect slightly increased. The first aralkyl quaternary compound, N-190, benzyl (mandelyltropinium) bromide, led us to make the important finding, also observed in connection with other compounds containing numerous monoquaternary groups of $AR\text{-}CH_2\text{-}X$ structure, that *aralkyl quaternary groups of such structure invariably reduce the parasympathicolytic, antimuscarine effect and intensify, in the majority of cases, the synaptic action.* Only two compounds, N-350 and A-60, were exceptions to this rule. For a possible explanation, see Table V. The introduction of electronegative substituents into the aromatic nucleus of the quaternary group intensifies the synaptic action. Benzylquaternaries containing the substituent in the p-position proved to be the most active, being 10 to 19 times as active as TEA, comparing the effective doses directly to TEA, while the molar activity of the compounds was 30 to 50 times that of TEA. The most marked curarine action was exerted by the m-bromo, p-nitro and p-metoxy-benzyl, as well as by the naphtylmethy derivatives (N-248, 263).

Preparing aromatic quaternary derivatives with condensed-ring brought the result that the most active ganglion blocking agents were the compounds containing a coaxially condensed ring, equivalent to p-substitution (4 phenyl-benzyl quaternary derivatives, N-310), while derivatives with linear or angular condensation (N-248, 263, 241) proved to be less active.

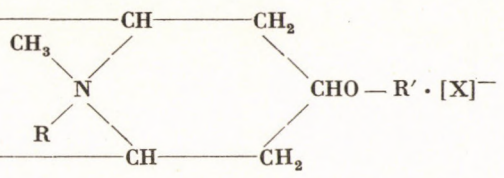
The mentioned 4-phenyl-benzyl(dl-mandelyl-anti-tropinium)bromide (N-310) was not only the most active member of the series, but also the most potent ganglion blocking compound hitherto known and reported (*Fig.* 4, *Fig.* 5). In

I. Table. Acetic-, dimetylcarbaminoic- and benzoic acid esters



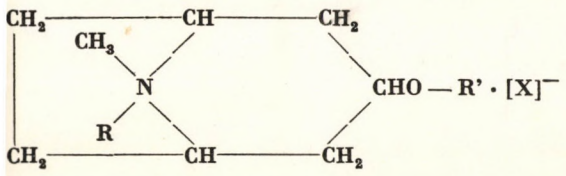
R	R'	X	Ganglion blocking effect: on Ggl. cervic sup. (Symp. ggl.) TEA=1.0	Ganglion blocking effect: on Blood pressure (Symp. ggl.) TEA=1.0	Ganglion blocking effect: Vagus blockade (Psy. ggl.) TEA=1.0	Ganglion blocking effect: Antinicotinic effect: on isolated guinea pig ileum atropine=1.0	Ganglion blocking effect: Antinicotinic effect: on isolated rabbit jejunum atropine=1.0	Curariform effect on frogs d-tubocurarine = 1,0	Parasympatholytic effect: on cat blood pressure Against carbaminoylcholine, atropine activity=1.0	Parasympatholytic effect: on isolated guinea pig ileum Against carbaminoylcholine, atropine activity=1.0	Parasympatholytic effect: on rabbit jejunum Against carbaminoylcholine, atropine activity=1.0	Parasympatholytic effect: on rat duodenum Against carbaminoylcholine, atropine activity=1.0	Approximate DL 50 intraperitoneally mg/kg	Notes
CH_3	$-COCH_3$	J	<0,3					< 0,02	×		×			Stimulating effect X
	$-COCH_3$	Br	2,0					0,10	×		<0,0005			
	$-COCH_3$	Br	1,5					0,05						—
CH_3-	$-CON(CH_3)_2$	J	<0,2					< 0,04	×		×			Stimulating effect X
	$-CON(CH_3)_2$	Br	3,0					0,05			0,0025			
CH_3-		J	<0,2					< 0,10	<0,015	0,02	0,04		75	
CH_3-		J	<0,4					0,07			<0,005			O—N cis
		Br	3,0					0,10	<0,01		0,004		55	
		Br	0,5					0,05			<0,005			O—N cis
		Br	8,2			<0,05		0,17				<0,003		DL Rat iv. 3,5 mg
		Br						0,08			<0,001			
		Br	8,0	7,0	7,0			0,20			0,005		45	
		Br	22,0	>16,0	>12,0	0,05	3,0	0,40		0,0025		<0,003	35	DL Rat 2,5 mg iv.
		Cl	10,0					0,40			0,007			
		Br	8.0					0,20			0,007			
		Br	2,6					0,10			<0,005			

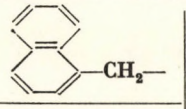
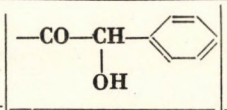
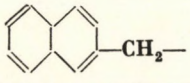
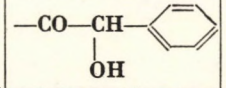
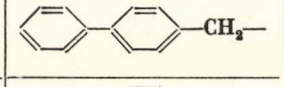
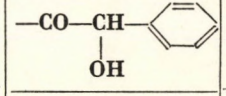
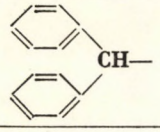
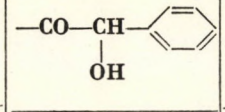
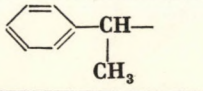
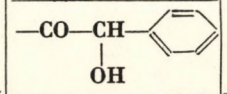
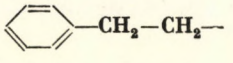
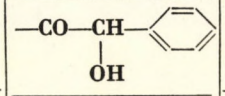
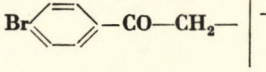
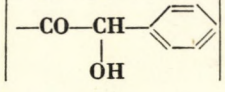
II. Table. Esters of dl- mandelic acid.



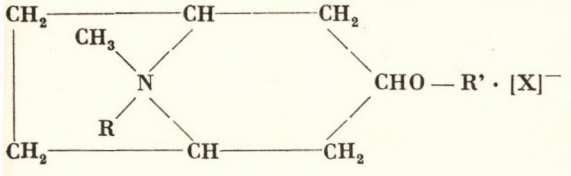
R	R′	X	Ganglion blocking effect: on Cgl. cervic sup. (Symp-ggl.) TEA=1.0	Ganglion blocking effect: on Blood pressure (Symp. ggl.) TEA=1.0	Ganglion blocking effect: Vagus blockade (Psy. ggl.) TEA=1.0	Ganglion blocking effect: Antinicotinic effect: on isolated guinea pig ileum atropine=1.0	Ganglion blocking effect: Antinicotinic effect: on isolated rabbit jejunum atropine=1.0	Curariform effect on frogs d-tubocurarine = 1,0	Parasympatholytic effect: on cat blood pressure	Parasympatholytic effect: on isolated guinea pig ileum	Parasympatholytic effect: on rabbit jejunum	Parasympatholytic effect: on rat duodenum	Approximate DL 50 intraperitoneally mg/kg	Notes
								Against carbaminoylcholine, atropine activity=1,0						
CH_3—	—COCH(OH)—C$_6$H$_5$	Br	4,5	2			<0,2	0,07	0,15		0,13	0,11	60	DL Rat iv. 20 mg
C_2H_5—	—COCH(OH)—C$_6$H$_5$	Br	2,2					0,07	0,05	0,07	0,15			
iC_3H_7—	—COCH(OH)—C$_6$H$_5$	Br	0,8					0,07			0,10			
C$_6$H$_5$—CH_2—	—COCH(OH)—C$_6$H$_5$	Br	3,0					0,10	0,005	0,01	0,004	0,013	82	DL Rat ip. > 130 mg
Br-C$_6$H$_4$—CH_2—	—COCH(OH)—C$_6$H$_5$	Br	4,1					0,17			0,015			
Br-C$_6$H$_4$—CH_2—	—COCH(OH)—C$_6$H$_5$	Br	6,8					0,20			0,025			
Br-C$_6$H$_4$—CH_2—	—COCH(OH)—C$_6$H$_5$	Br	19,0	20,0		0,12	2,0	0,12	0,015		0,015		53	DL Rat iv. 10 mg
Cl-C$_6$H$_4$—CH_2—	—COCH(OH)—C$_6$H$_5$	Br	16,0	15,0				0,12					46	
CH_3-C$_6$H$_4$—CH_2—	—COCH(OH)—C$_6$H$_5$	Br	14,0					0,07	<0,05		0,01		50	DL Rat iv. 15 mg
NO_2-C$_6$H$_4$—CH_2—	—CO—CH(OH)—C$_6$H$_5$	Br	16,0					0,20			0,05			
CH_3O-C$_6$H$_4$—CH_2—	—CO—CH(OH)—C$_6$H$_5$	Br	8,0	> 4,0				0,20			0,03			

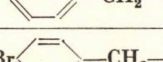
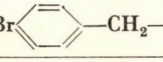
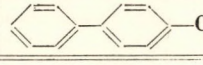
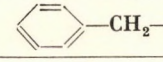
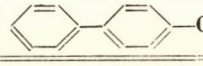
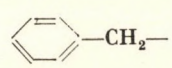
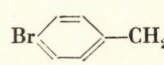
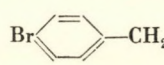
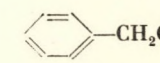
II. Table. Esters of dl- mandelic acid. (Continued)



ial nber	R	R′	X	Ganglion blocking effect: on Ggl. cervic sup. (Symp. ggl.) TEA=1.0	Ganglion blocking effect: on Blood pressure (Symp. ggl.) TEA=1.0	Ganglion blocking effect: Vagus blockade (Psy. ggl.) TEA=1.0	Ganglion blocking effect: Antinicotinic effect: on isolated guinea pig ileum atropine=1.0	Ganglion blocking effect: Antinicotinic effect: on isolated rabbit jejunum atropine=1.0	Curariform effect on frogs d-tubocurarine = 1,0	Parasympatholytic effect: on cat blood pressure Against carbaminoylcholine, atropine activity=1.0	Parasympatholytic effect: on isolated guinea pig ileum Against carbaminoylcholine, atropine activity=1.0	Parasympatholytic effect: on rabbit jejunum Against carbaminoylcholine, atropine activity=1.0	Parasympatholytic effect: on rat duodenum Against carbaminoylcholine, atropine activity=1.0	Approximate DL 50 intraperitoneally mg/kg	Notes
248			Cl	7,0					0,20	0,05			0,015	45	
263			Br	4,0					0,20	<0,05		<0,025			
310			Br	40,0		>35	0,25	2,0		0,015	0,02	0,01		48 ± 6,2	DL Rat 10 mg iv.
241			Br	0,7					<0,05	0,02					
271			Br	1,6					0,05	<0,03			<0,05		
213			Br	1,0					0,04	0,02		0,02	0,05		
237			Br	4,0				<0,1	0,25	<0,1		0,015			

III. Table. Phenylacetic-, diphenylacetic- and tropic acid esters.



ial mber	R	R'	X	Ganglion blocking effect: on Ggl. cervic sup. (Symp. ggl.) TEA=1.0	Ganglion blocking effect: on Blood pressure (Symp. ggl.,) TEA=1.0	Ganglion blocking effect: Vagus blockade (Psy. ggl.) TEA=1.0	Antinicotinic effect: on isolated guinea pig ileum atropine=1.0	Antinicotinic effect: on isolated rabbit jejunum atropine=1.0	Curariform effect on frogs d-tubocurarine =1,0	Parasympatholytic effect: on cat blood pressure Against carbaminoylcholine, atropine activity=1.0	Parasympatholytic effect: on isolated guinea pig ileum Against carbaminoylcholine, atropine activity=1.0	Parasympatholytic effect: on rabbit jejunum Against carbaminoylcholine, atropine activity=1.0	Parasympatholytic effect: on rat duodenum Against carbaminoylcholine, atropine activity=1.0	Approximate DL 50 intraperitoneally mg/kg	Notes
308	CH_3—	—$COCH_2$—	J	3,0					0,15	<0,1		0,08			
309		—$COCH_2$—	Br	4,8					0,15			0,01			
340	Br	—$COCH_2$—	Br	9,0								0,003			
351		—$COCH_2$—	Br	10,0			0,07	2,0	0,5			<0,01			
278	CH_3—	—$COCH(C_6H_5)_2$	J	5,3					<0,05	0,08		0,05			
299		—$COCH(C_6H_5)_2$	Br	2,0					0,15			0,01			
350		—$COCH(C_6H_5)_2$	Br	10,0			1,0		0,25			0,01			
	CH_3—	—CO—CH(—CH_2OH)—	Br	4,0					0,15						
-60		—CO—CH(—CH_2OH)—	Br	2,1					0,18	0,25		0,1			
-243	Br	—CO—CH(X)—CH_2OH	Br	8,5			1,0	2,0	0,17	0,15		0,07			× dl—
-259	Br	—CO—CH(X)—CH_2OH	Br	7,5					0,17	0,15		0,1			× l—
-238		—COCH(—CH_2OH)—	Br	0,7					<0,05	>0,5		0,15			

nictitating membrane experiments it proved to be 40,6±4,3 times as active as TEA (on basis of 13 experiments), while in molar terms its activity is 100,6 times that of TEA. In the dog, it blocks vagal synapses at least 30 times more effectively than TEA. In the cat, it has proved to be 3 times more potent as a vagal blocking agent than has hexamethonium (Fig. 6). In the doses tested, it inhibited vagal stimulation only and did not suppress the blood pressure lowering action of carbaminoylcholine. It exhibited a marked antinicotine action in isolated intestine experiments (guinea pigs, rabbits). Thus the compound appears to possess an activity equivalent to that exhibited by the strongest antinicotine agents (Trasentine, Diparcol) (15). Its curarine effect is very weak and this effect is weaker in mammals than the similar effect of N-266, the most active member of the benzoyltropinium series. DL_{50} in mice, 48±6,2 mg/kg ; minimal lethal dose in rats, 10 mg/kg intravenously.

The second most active member of the series is compound N-239, the pharmacological properties of which have been discussed in detail by *Issekutz* (6). It is half as active on autonomic ganglia as the compound N-310. As regards side effects and toxicity, it is similar to N-310, thus its therapeutic index is inferior to that of the latter.

Contrary to these active substances, the quaternary derivatives of mandelyltropine containing quaternary groups of other type than AR-CH_2-X, e. g. the phenylethyl and phenacyl derivatives N271, 213 and 237, as well as the diphenylmethyl derivative N-241 possess only weak ganglionic effects, and even weaker effects on the neuromuscular junction. In the latter respect compound N-237 is an exception. As regards antimuscarine action, α and β phenylethyl derivatives are more active than benzyl derivatives (N-190).

The conclusions drawn from the data in Table II concerning ganglionic and antimuscarine effects are adaptable also to the aromatic acid tropeines listed in Table III. Here too, the introduction of quaternaries with an AR-CH_2-X structure into the phenylacetyl, diphenylacethyl and tropyl-tropine derivatives decreases the antimuscarine effect, and, with the exception of two compounds (N-299 and A-60), it increases the ganglion blocking potency. In this case also, p-phenylbenzyl and p-brombenzyl derivatives were found to be the most active.

From the point of view of ganglion blocking action, it appeared interesting to compare the substitution of methylquaternaries by benzyl with the role played by the acid groups in various tropine esters.

Thus, according to the above, if in the tropeine molecule an extensive area is occupied sterically by the acid group, substitution of the N-methyl with benzyl does not increase the activity, which even suffers a decrease in the presence of some sterically great acid groups. In other words, an increase in ganglion blocking activity proportional to the sterical dimension of the tropeine acid group occurs in the methylquaternaries, while the activity of benzylquaternaries remains unchanged. In this respect, the ratio of the relative activities of the two

TABLE IV

Acid group	Ganglion blocking activity TEA = 1,0				
	methylquaternary		benzylquaternary		methyl / benzyl
Acetyl	(N-180)	0,3	(N-228)	2,0	0,15
Dimethylcarbaminoyl.....	(N-277)	0,2	(N-268)	3,0	0,06
Benzoyl.....	(N-160)	2,0	(N-220)	3,0	0,66
Phenylacetyl	(N-308)	3,0	(N-309)	4,8	0,63
dl mandelyl	Novatropine	4,5	(N-190)	3,0	1,80
Tropyl	Atropine methyl bromate	4,0	(A-60)	2,1	1,80
Diphenylacetyl	(N-278)	5,2	(N-299).	2,0	2,65

quaternaries (methyl/benzyl), supplies useful information, being increased in direct proportion with the size of acid groups.

Data relative to the ganglion blocking selectivity of the compounds are presented in Table V.

TABLE V

Symbol of compound	Ganglion blocking / Curarine effect	Ganglion blocking / antimuscarine effect	Antinicotine / antimuscarine effect
N-266	55	8800	20
N-239	160	1250	8
N-310	235	2700	16
N-350	40	1000	10
N-243	50	57	10
d-tubocurarine	3	—	—
Atropine	—	0,3	1,0
TEA	15	—	—

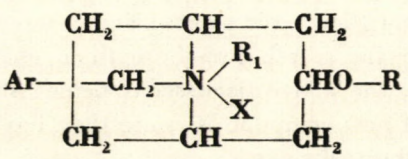
In the Table we attempted to illustrate the selectivity of compounds. The individual ratios were obtained in the manner that in the case of »ganglion blocking/curarine« ratio, the ganglion blocking activity related to TEA was divided with the curarine activity related to d-tubocurarine. In the case of »ganglion blocking/antimuscarine« ratio, the ganglion blocking activity related to TEA was divided with the antimuscarine activity related to atropine. When calculating the »antinicotine/antimuscarine« ratio, the antinicotine activity estimated on guinea pig ileum was related to that of atropine and it was divided with the antimuscarine activity, also related to that of atropine. It is clearly understandable from the Table that when the curarine side effect is considered,

the most selective ganglion blocking agent is N-310, since it is considerably more specific than TEA. On comparing the ganglion blocking resp. antinicotine effects with the antimuscarine action, it is found that N-266 is the most selective compound but the specificity exhibited by N-310 is also very significant. Of course, the ratios represent relative differences only, the ganglion blocking effects being compared in the cat and the curarine actions in the frog.

The ganglion blocking/antimuscarine and the antinicotine/antimuscarine ratios show clearly how much stronger an activity the ganglion blocking tropeines possess, as compared to that of atropine. On the basis of ganglion blocking action and rat toxicity ratios, the following values are obtained for the therapeutic range N-266 = 1,0 ; N-239 = 8,0 ; N-350 = 3,0 ; N-243 = 1,0; d-tubocurarine = 0,01 ; and TEA = 1,3. When the ganglion blocking and mouse toxicity ratios are considered, the following results are obtained, taking the therapeutic range of N-266 for unit ; N-239 = 1,4 ; N-310 = 2,7 ; and TEA = 0,1. This shows clearly that the substances in question possess wider therapeutic ranges than TEA, when the toxicity for rats and mice is considered.

In the present series of experiments we succeeded in extending and further confirming those earlier observations, according to which a change in the chemical structure offers means for obtaining quaternary tropeines of entirely different properties and selectivity. Beside the known parasympathicolytic effects, the ganglion blocking action of quaternary tropeines was first demonstrated (16). On the basis of this observation, and by making use of experience obtained in connection with simple aliphatic quaternary ammonium compounds (17), in the present series we succeeded in preparing compound N-310, the most active ganglion blocking compound hitherto known. It has been shown, in addition, that although the majority of quaternary tropeines exerts an anticholinergic effect, there are some so far unknown cholinergic stimulants (8), as well as local anaesthetics, among them (9). In the present work, evidence could be obtained according to which at the ganglionic site of action the tropeine molecule structure may exert a stimulative effect which in the case of the above discussed compound N-361 is so strong that, calculated in molar terms, it surpasses about five times that of nicotine. The most potent nicotine-stimulants hitherto known were the choline ethers described by *Hey* (19), that possessed an approximately similar activity.

Thus in our opinion the



structure is the most favourable concerning the ganglion blocking, ganglion stimulating and curarine actions. It can be seen from the above that the quaternary tropeines possess numerous pharmacological properties. By modifying the quaternary structure and the ester group it became possible to intensify some of their effects and to obtain compounds of a highly selective action. Considering that previously the only effect known of tropeines was the parasympathetic one with the atropine as the most potent parasympathicolytic compound, it was natural to start from the atropine structure for synthetising parasympathicolytic compounds. We have succeeded in demonstrating that tropeines exhibit also other properties, of which by means of proper changes in the molecular structure the ganglion blocking and ganglion stimulating effects could be intensified, thus allowing to prepare compounds exerting the strongest effects so far known. Therefore it is suggested that in future search for compounds possessing similar effects, the tropeines should be taken for model. While substitution of cyclic aminoalcohol (tropine) by aliphatic ones brought the desired result in the parasympathicolytic action (20, 21), no favourable ganglionic effects can be expected to result from transforming tropeines in that way. There is evidence that, in contrast with the antimuscarine effect in antinicotinic action the essential requirement is a cyclic aminoalcohol nature of the compound.

Summary

43 new quaternary tropeines have been tested with special attention to the correlation between chemical structure and effect. The outstanding feature of the compounds was mostly the blocking effect exerted on autonomic ganglia, but as side effects, parasympathicolytic, curariform and local anaesthetic actions of varying intensity could also be observed. The most active ganglion blocking agents were the p-phenylbenzyl and p-halobenzyl quaternaries. Compound N-310, 4-phenyl-benzyl- (dl-mandelyl-tropinium)-bromide, has proved to be the most potent compound possessing a ganglion blocking effect 40 times (in molar calculation, 100 times) stronger than that of TEA. Its side effects, as compared with its ganglion blocking action, are not appreciable. Its therapeutic range, on basis of informative studies, proved to be wider than that of TEA. There are tropeines possessing muscarine effects among the compounds described (N-180, N-277). Compound N-361, 4-phenyl-benzyl(benzoyltropinium)bromide, is a very potent sympathetic ganglion stimulant, being in molar terms about 5 times as active as nicotine. In the search for the optimal chemical structure required for ganglionic effects, the above discussed tropeines should be used as models for the preparation of new compounds, since they have proved to be the most active compounds hitherto known.

TABLE VI

Compound N-310. Parasympathetic ganglion blocking (vagal blocking) and parasympathetic nerve ending blocking action in the dog, as compared with TEA and atropine.

	Decrease in pulse rate on vagal stimulation	Fall in blood pressure on vagal stimulation mm	Fall in blood pressure on 0,5 ng/kg of carbaminoylcholine mm
Control	62	56	60
After 30 g/kg of N-310	40	20	40
After 30 g/kg of (6')	58	26	40
After 10 minutes interval ...	60	40	42
After 50 g/kg of N-310	28	∅	24
After 50 g/kg of (6')	46	15	36
After 50 g/kg of (10')	64	24	42
After a 10 min. interval	65	46	56
After 1 omg TEA	30	0	30
After 1 omg TEA (6')	62	16	32
After 1 omg TEA (10')	55	20	—
After a 10 min. interval	58	48	44
After 1,0 g/kg of atropine...	50	46	20
After 1,0 g/kg of atropine (6')	56	42	30
After 3,0 g/kg of atropine ..	49	18	6
After 3,0 g/kg of atropine (6')	—	12	20
After 3,0 g/kg of atropine (10')	46	10	18

LITERATURE

1. *Gyermek, L.* and *Sztanyik, L.:* Acta Physiol. Hung. **2**, 41 (1951).
2. *Gyermek, L.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 511 (1952).
3. *Gyermek, L.:* Acta Physiol. Hung. **2**, 175 (1951).
4. *Bülbring, E., Depierre, F.:* Brit. J. Pharmacol. **4**, 22 (1949).
5. *Gyermek, L.:* Orvosi Hetilap 808 (1951).
6. *Issekutz, B. Sen.:* Arch. exp. Path. u. Pharm. **215**, 283 (1952).
7. *Gyermek, L.* and *Nádor, K.:* Acta Physiol. Hung. **3**, 183 (1952).
8. *Gyermek, L.* and *Nádor K*, Kisérletes Orvostnd.: **3**, 112, (1952).
9. *Gyermek, L.:* Acta Physiol. Hung. In print.
10. *Nádor, K.* and *Gyermek, L.:* Magy. Kém. Folyóirat **57**, 349 (1951).
11. *Nádor, K.* and *Gyermek, L.:* Patent Claim. 1951.
12. *Nádor, K.* and *Gyermek, L.:* Acta Chim. Hung. In print.
13. *Fodor, G.* and *Nádor, K.:* Nature **169**, 468 (1952).
14. *Gyermek, L.* and *Nádor, K.:* In print.
15. *Tripod, J.:* Brit. J. Pharmacol. **4**, 323 (1949).
16. *Sztanyik, L., Láng, E.* and *Gyermek, L.:* Meeting of Hung. Physiol. Soc. Szeged, 1950.
17. *Nádor, K.* and *Gyermek, L.:* Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Tudományok Osztálya Közleményei (1952.)
18. *Cahen, R. L.* and *Tvede, K.:* J. Pharmacol. **105**, 166 (1952).
19. *Hey, P.:* Brit. J. Pharmacol. **7**, 117 (1952).
20. *v. Braun, J., Braunsdorf, O.* and *Räth, K.:* Ber. dtsch. Chem. Ges. **55**, 1666 (1922).
21. *Fromherz, K.:* Arch. für exp. Pharm. u. Path. **173**, 86 (1932).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЕЩЕСТВ ПАРАЛИЗИРУЮЩИХ ХОЛИНЕРГИЧЕСКУЮ СИСТЕМУ. V. ФАРМАКОЛОГИЯ МОНОЧЕТВЕРТИЧНЫХ ТРОПЕИНОВ ДЕЙСТВУЮЩИХ НА ВЕГЕТАТИВНЫЕ ГАНГЛИИ

Л. Дьермек и К. Надор

Фармакологический институт медицинского университета и фармакологический исследовательский институт, г. Будапешт

Р е з ю м е

Авторами было исследовано 43 новых четвертичных тропеина, с особым вниманием на связь между химической структурой и действием. Основным действием этих соединений можно в общем рассматривать парализирующее действие на вегетативные ганглии. Наряду с этим, в качестве побочного действия проявляются парализирующее парасимпатическую нервную систему, кураре подобное или местное обезболивающее действия различной степени. В отношении их парализирующего действия на ганглии самыми эффективными оказались п-фенилбензилные и п-галобензилные четвертичные производные различных тропеинов. Самыми активными авторы нашли 4-фенил-бензил (dl-манделил-тропинием) бромид с условным обозначением № 310, который парализирует вегетативные ганглии в 40 раз, по мелярному вычислению в 100-раз сильнее ТЕА. Побочные действия этого соединения по сравнению с его парализирующем ганглии действием незначительны. По информационным исследованиям пределы его терапевтического действия шире ТЕА. Среди описанных авторами тропеинов имеются и тропеины с мускарин-подобным действием. (№ 180, № 277). 4-фенил-бензил-(бензойл-тропинием) бромид с условным обозначением № 361 проявляет весьма сильное возбуждающее действие на симпатические ганглии, которое в молярном отношении приблизительно пятикратно сильнее действия никотина. Авторы того мнения, что при отыскивании необходимой для ганглионарных воздействий оптимальной химической структуры следует исходить из вышеизложенных тропеинов, как из известных до сих пор самых активных тропеинов.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG GEFÄSSERWEITERNDER MITTEL BEI EXPERIMENTELLER RENALER HYPERTONIE VON RATTEN

Von

F. HERR, L. GYÖRGY, J. PÓRSZÁSZ und J. BONTA

PHARMAKOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen: am 5. November 1952)

Nach den Untersuchungen von *Nikolajev* (1) und *Mentova* (2) setzt Nitroglyzerin intravenös verabfolgt den Blutdruck hypertonischer Hunde in viel grösserem Masse herab, als den der Kontrolltiere ; andererseits wird durch Papaverin, das man klinisch häufig als gefässerweiterndes Mittel verwendet, der Blutdruck von Normaltieren nicht herabgesetzt, sondern manchmal sogar erhöht. Die in der Therapie üblichen gefässerweiternden Mittel werden meist peroral angewandt, daher erreichen sie infolge der Resorptionsverhältnisse langsamer das wirksame Blut-Niveau, als unmittelbar in die Vene injiziert. Der überwiegende Teil unserer die Wirkungsstärke der Vasodilatatoren betreffenden Daten stammt aus Versuchen, die an narkotisierten Tieren mit intravenöser Injektion ausgeführt wurden.

In der vorliegenden Arbeit suchten wir die Wirkungsstärke der an verschiedenen Punkten angreifenden Pharmaka unter anderen — den therapeutischen Erfordernissen mehr entsprechenden — Bedingungen, also an nicht narkotisierten normalen und hypertonischen Ratten nach subkutaner Verabfolgung (wo die Resorption ebenfalls langsam verläuft) zu vergleichen.

Methodik

Wir benutzten für unsere Versuche 150—200 g schwere normale und nach *Grollmann* (3) operierte weisse Ratten. Die rechte Niere wurde unter sterilen Bedingungen in Aethernarkose entfernt und um die linke Niere ein achterförmig geschlungener dicker Seidenfaden gelegt. Die Eingriffe wurden in ein oder zwei Sitzungen ausgeführt, im letzteren Fall folgte die Entfernung der rechten Niere zwei bis drei Wochen nach der ersten Operation. 30—40% der in einer Gruppe operierten Tiere d. h. insgesamt 72 von 187 Tieren wurden nach dem Eingriff hypertonisch. Der Blutdruck der nicht narkotisierten Tiere wurde an einem ihrer Hinterbeine mittels der von uns modifizierten Photozellenmethode von *Kersten* u. Mitarb. gemessen (4.5). Der Blutdruck der Normalratten betrug durchschnittlich 121 $\pm$6 Hgmm. Als hypertonisch wurde die Ratte nur dann angesehen, wenn der Blutdruck bis 150 Hgmm stieg. Am häufigsten schwankte der Wert zwischen 170—180 Hgmm, stieg aber in mehreren Fällen über 200 Hgmm.

Wir verglichen die Wirkungen der unmittelbar auf die Gefässe wirkenden Mittel wie Papaverin, Perparin und Theophyllin, das parasympathischen Nervenendigungen reizendes Doryl, das sympathicuslähmende Yohimbin, das ganglionlähmende N 239 (p. Brom-benzyl-mandelyl-tropinium Br) (6) und den Bezold-reflex auslösendes Veratrin (Veratrin puriss. Merck). Ausserdem untersuchten wir das Veratrin-methyljodid und das Veratrin-benzylbromid und führten Versuche auch mit Sevenal und Kohlendioxyd aus. Die Pharmaka wurden in 0,9%-iger

Kochsalzlösung subkutan in 0,2—2,0 ml Menge verabfolgt, das CO_2 liessen wir in 5—10% Konzentration während der Messungzeit einatmen. Einen Teil der Kontrollversuche führten wir an operierten aber nicht hypertonisch gewordenen Ratten aus, womit wir die Frage entscheiden wollten, ob der Unterschied zwischen den normalen und den hypertonischen Tieren nicht etwa durch die infolge der Nephrektomie verminderten Ausscheidung der Pharmaka bedingt sei. Die Ergebnisse zeigten aber, dass in dieser Hinsicht die hypertonischen Ratten sich den Normaltieren völlig ähnlich verhielten.

Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer Versuche über die Wirkung der Vasodilatatoren sind in der Tabelle I dargestellt. Die Blutdruckmessungen wurden nach der Verabfolgung von Papaverin, Perparin, Theophyllin und Veratrin in 5—15 minutigen Intervallen ausgeführt. In etwa 90% der Fälle erreichte die Senkung in der 20.—25. Minute ihr Maximum. In der Tabelle sind die Mittelwerte der in der 25. Minute gemessenen Tensionen dargestellt. Von diesem Zeitpunkt an ging die Tension allmählich wieder in die Höhe und erreichte in 90—120 Minuten nach der Injektion wieder ihren Originalwert. Die Wirkung von Doryl, Yohimbin und N 239 war schon früher bemerkbar, hier führten wir die Messungen in 3—5 minutigen Abständen aus. Die grösste Blutdrucksenkung beobachteten wir in der 12.—18. Minute, (in der Tabelle sind diese Werte dargestellt) und die Wirkung dieser Stoffe dauerte höchstens 30—40 Minuten. Mit Ausnahme des Veratrins setzen die nicht toxischen Dosen der Vasodilatatoren den Blutdruck der Normaltiere nicht herab (die in der Tabelle sichtbare Senkung von 8 mm ist nicht signifikant), dagegen erzeugen sie bei hypertonischen Tieren schon in kleinen Dosen eine wesentliche Druckerniederung.

Es ist bemerkenswert, dass 80 mg/kg Papaverin an hypertonischen Ratten keine grössere Blutdrucksenkung hervorruft als 40 mg/kg desselben Mittels, desgleichen vermindert 60 mg/kg Theophyllin den Blutdruck der hypertonischen Tiere nicht mehr als eine Dosis von 30 mg/kg. Der durch diese Dosen erzeugte tiefere Blutdruck liegt etwas über dem Durchschnittswert der Normaltiere und dürfte durch Vergrösserung der Dosis nicht unter dieses Niveau gebracht werden. Beachtenswert ist auch die Tatsache, das Perparin, dessen krampflösende Wirkung auf die glatte Muskulatur 2—3mal stärker ist, als die des Papaverins *[Issekutz* (7)*]*, die Tension nur ebenso stark herabsetzt wie Papaverin.

Doryl in der Menge von 0,3 mg/kg übt gar keinen Einfluss auf den Blutdruck von Normalratten aus, auch an hypertonischen erzeugt es nur eine geringe Senkung, obwohl die parasympatischen Reizsymptome (Speichelfluss, Diarrhoea, Chromodacryorrhoea) sehr ausgesprochen in Erscheinung treten. Bei drei von den fünf Ratten stieg die Tension 45—60 Minuten nach der Injektion sogar 10—20 Hgmm über den Ausgangswert.

Im Gegensatz zu den bisher erörterten Pharmaka sahen wir bei Veratrin keinen Unterschied zwischen den normalen und hypertonischen Tieren, da 0,2

TABELLE I

Das untersuchte Pharmakon	Dosis mg/kg	Normal			Blutdruckänderung	Hypertonisch			Blutdruckänderung
		Zahl der Tiere	Tension Hg mm vor	Tension Hg mm nach		Zahl der Tiere	Tension Hg mm vor	Tension Hg mm nach	
Papaverin	20	10	125±5	130±6	+5	10	174±19	165±20	—9
	40	10	128±7	120±4	—8	10	166±16	130±20	—36
	80	10	120±7	112±10	—8	10	171±18	131±17	—40
Perparin	20	—	—	—	—	5	177±11	162±7	—15
	40	3	120±5	121±4	+1	5	168±10	140±12	—28
	80	5	122±6	124±5	+2	—	—	—	—
Theophyllin	30	2	116	117	+1	5	162±7	131±8	—31
	60	6	127±6	121±7	—6	5	176±9	138±10	—38
Doryl	0,2	—	—	—	—	5	158±8	156±9	—2
	0,3	5	122±5	122±4	0	5	164±4	153±9	—11
Veratrin	0,2	5	124±3	121±6	—3	5	170±7	166±9	—4
	0,5	5	123±7	98±9	—25	5	188±10	144±12	—44
	1,0	—	—	—	—	2	182	115	—67
Yohimbin	—	—	—	—	—	15	157±4	149±8	—8*
	0,1	5	117±6	114±8	—3	10	172±16	139±5	—33**
N 239	—	—	—	—	—	21	159±9	152±7	—7*
	5,0	11	122±8	117±7	—5	10	164±15	140±10	—24**

* Ratten mit Frühhypertonie.
** Ratten mit Späthypertonie.

mg/kg auf die Tension beider Gruppen wirkungslos war, andererseits setzte 0,5 mg/kg den Blutdruck sowohl normaler als hypertonischer Ratten wesentlich herab. Hier scheint also kein Unterschied in der Empfindlichkeit normaler und hypertonischer Tiere zu bestehen.

Die Toxizität vom Veratrin-methyljodid und -bezylbromid ist geringer als die des Veratrins (8), daher untersuchten wir auch ihre Wirkung auf den Blutdruck, aber mit dem Ergebnis, dass die blutdrucksenkende Wirkung vom Veratrin mit der Quaternisierung verloren geht, bzw. beträchtlich abnimmt.

Nachdem wir in Vorversuchen die Erfahrung gemacht hatten, dass Yohimbin in der Menge von 0,1 mg/kg den Blutdruck der Normalratten nicht beeinflusst,

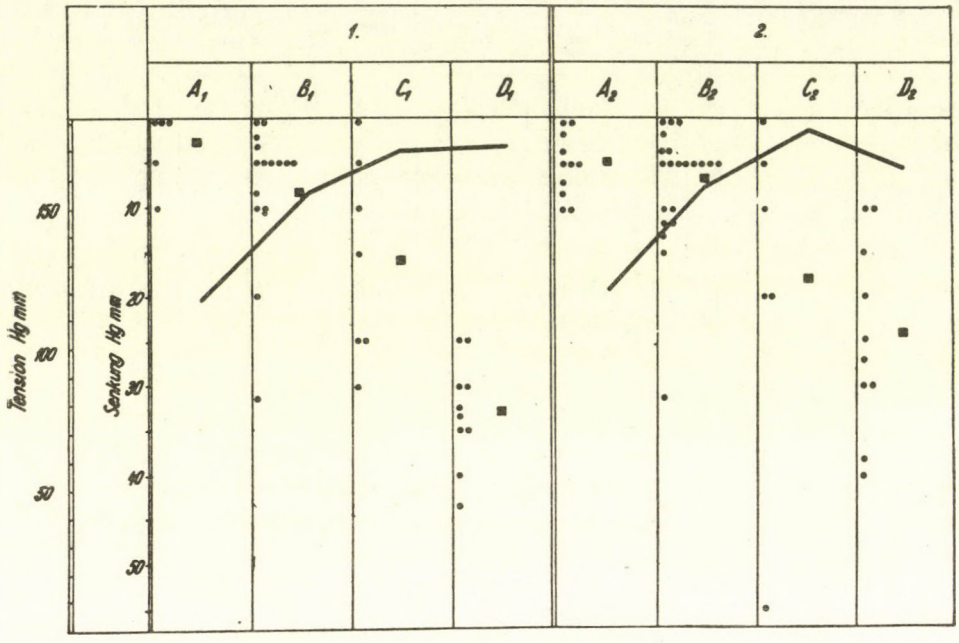


Abb. 1. Wirkung von 0,1 mg/kg Yohimbin und 0,5 mg/kg N 239 auf den Blutdruck der früh- und spät-renalhypertonischen Ratten.

1.=0,1 mg/kg Yohimbin; 2.=5,0 mg/kg N 239; A_1=Normalkontrolle; B_1=0—1 Monate nach dem Eingriff; C_1=1—2 Monate nach dem Eingriff; D_1=4—10 Monate nach dem Eingriff; A_2=Normalkontrolle; B_2=0—5 Wochen nach dem Eingriff; C_2=5 Wochen—3 Monaten nach dem Eingriff; D_2 3—10 Monate nach dem Eingriff.

● Die bei den einzelnen Messungen erhaltenen Senkungen in Hgmm.
■ Mittelwert der Senkungen.
— Die ausgezogene Linie bedeutet den Mittelwert des Anfangsdrucks.

Signifikante Differenz A_1—D_1 10,3
B_1—D_1 8,3
A_2—D_2 5,7
B_2—D_2 5,4

$$\text{Sign. Diff.} = \frac{m_x - m_y}{\sqrt{n_1\sigma_x^2 + n_2\sigma_y^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1+n_2-2)}{n_1+n_2}}$$

m_x und m_y=sind die Durchschnittswerte der Senkungen
σ_x und σ_y=die quadratische Abweichung
n_1 und n_2=Zahl der Tiere

aber an späthypertonischen Ratten (9) eine bedeutende Senkung erzeugt, verglichen wir die Wirkung dieser Dosis an Früh- und Späthypertonie leidenden Tieren und sahen, dass an solchen Ratten, die schon vier Wochen nach der Operation hypertonisch wurden, das Yohimbin zu jenem Zeitpunkt keine wesentliche

Änderung der Tension hervorruft. Andererseits beobachteten wir an denselben Tieren vom vierten bis zum zehnten Monat — aus dem Durchschnitt von 10 Messungen berechnet — eine Senkung von 33 Hgmm. Die gleiche Wirkung hat das ganglionlähmende N 239, das in einer Dosis von 5 mg/kg den Blutdruck weder bei normalen, noch bei hypertonischen Tieren ändert, in der Späthypertonie aber eine beträchtliche Senkung verursacht. Die gewonnenen ausführlichen Ergebnisse mit diesen zwei Pharmaka sind in der Abbildung 1. mitgeteilt, welche auch die signifikante Differenz zwischen den Messungen an früh- und späthypertonischen Ratten veranschaulicht. Wie aus der Abbildung ersichtlich, beträgt die signifikante Differenz bei Yohimbin 8,3, bei N 239 5,4.

Wir prüften auch das Sevenal, dieses in der Therapie der Hypertonie häufig benutzte Mittel und fanden, dass 30—60 mg/kg Sevenalnatrium den Blutdruck weder normaler noch hypertonischer Ratten herabsetzt, es zeigte sich sogar in einzelnen Fällen ein geringer Anstieg (10—15 Hgmm) der Tension. Diesbezüglich führten wir Kontrollversuche aus mit Blutdruckmessungen auf blutigem Wege (an urethannarkotisierten Ratten mittels einer in die Carotis eingebundener Kanüle), wo wir die gleiche Dosis Sevenal ebenfals subkutan injizierten und auch hier keine Blutdruckerhöhung beobachteten. Grössere, narkotisierende Dosen (120 mg/kg) setzten aber den Blutdruck auch an normalen Ratten herab.

Zur Prüfung der Reizbarkeit des Vasomotorzentrums haben wir Versuche an je zehn normalen und hypertonischen Ratten mit Inhalation von 5—10%-igem CO_2 unternommen, die maximal zehn Minuten dauerte. Das 5%-ige CO_2 übte keinen Einfluss auf die Tension aus, aber das 10%-ige erzeugte eine schnell abklingende Steigerung, die an Normalratten 17, an hypertonischen 15 Hgmm betrug. In der 3.—4. Minute der Inhalation fiel der Blutdruck wieder auf den Ausgangswert herab und verblieb an Normaltieren trotz der fortgesetzten Inhalation auch weiter auf diesem Niveau. Bei den hypertonischen Tieren folgte aber der Drucksteigerung eine vom Ausgangswert gerechnete Senkung von durchschnittlich 20 Hgmm, die bis zur Beendigung der Inhalation dauerte, nach welcher der Blutdruck wieder auf seinen Originalwert (170 Hgmm) stieg. CO_2 erweitert die peripheren Gefässe (10) und diese Wirkung scheint an hypertonischen Tieren mehr ausgesprochen zu sein als an normalen. In der Reizbarkeit des Vasomotorzentrums fanden wir dagegen keine Differenz.

Besprechung der Ergebnisse

Die unmittelbar auf die Gefässe wirkenden Vasodilatatoren setzen schon in kleinen Mengen den Blutdruck hypertonischer Ratten herab, dagegen üben sie in nicht toxischen Dosen keine Wirkung auf die Tension der Normaltiere aus. Somit haben wir die an renal hypertonischen Hunden mit Papaverin gewonnenen

Ergebnisse von *Nikolajev* (1) unter anderen Versuchsbedingungen auch an Ratten bestätigen können und hatten ähnliche Erfahrungen auch mit anderen Vasodilatatoren. Dies bezieht sich auch auf die gefässerweiternde Wirkung von CO_2.

Die *Grollmann*'sche Operation, welche durch Ischämisierung der Niere zur Hypertonie führt, erzeugt die Blutdrucksteigerung durch Freiwerden von Renin. Nach *Pickering* (11) ist das Freiwerden von Renin nur in der ersten Zeit nach der Operation für die Blutdrucksteigerung verantwortlich. Später hört aber die Reninproduktion auf und doch bleibt der Blutdruck auf dem früheren hohen Niveau. Nach *Dumont* (12) wird dies durch die irreversible Veränderung der Gefässe verursacht, obwohl der histologische Beweis weder von ihm noch von *Pickering* erbracht werden konnte. *Ogden* und seine Mitarbeiter schreiben im Verbleiben der renalen Hypertonie Nerveneinflüssen eine Rolle zu, was sie damit beweisen, dass die über das Nervensystem wirkenden drucksenkenden Mittel (Yohimbin, Pentobarbital, F863) in der Späthypertonie der Ratten viel stärker wirken, als im Frühstadium (9). *Moss* und *Wakerlin* (13) konnten in der Empfindlichkeit gegenüber den Pharmaka, welche gleichen Angriffspunkt besitzen, keinen Unterschied zwischen den früh- und späthypertonischen Tieren finden. Unsere Versuche bestätigen die Ergebnisse von *Ogden*, und seine Mitarbeiter weil die Ausschaltung des Sympathicustonus durch Arzneimittel (Yohimbin, N 239) an späthypertonischen Ratten schon in solchen Mengen eine beträchtliche Blutdrucksenkung verursacht, welche im Frühstadium der Hypertonie (Reninproduktion), oder an Normaltieren die Tension nicht beeinflussen.

Unsere mit Sevenal gewonnenen Resultate stehen im Einklang mit den klinischen Erfahrungen und Versuchen von *Mjassnikow*, nach welchen bei hyperSonischen Kranken von gewisser Nervenkonstitution das Krankheitsbild durch tevenal nicht gebessert, sondern verschlimmert und der Blutdruck erhöht wird (14).

Zusammenfassung

Wir verglichen die Wirkung verschiedener Pharmaka auf den Blutdruck bei nicht narkotisierten normalen und an experimenteller renaler Hypertonie leidenden Ratten. Die von uns untersuchten Vasodilatatoren (Papaverin, Perparin, Theophyllin, Doryl, Yohimbin, N 239 (p-Brom-benzyl-mandelyltropinum Br) setzten den Blutdruck hypertonischer Tiere schon in kleinen Dosen herab, hatten aber in nicht toxischen Dosen keinen Einfluss auf den Blutdruck der Normaltiere. Bei Veratrin wurde ein solcher Unterschied nicht gefunden.

Yohimbin und N 239 wirkten im Früh- und Spätstadium der Hypertonie verschiedenartig, indem sie die Tension im Spätstadium schon in solchen Dosen herabsetzten, die im Frühstadium noch unwirksam waren.

Wir prüften noch die Wirkung der CO_2-Inhalation und des Sevenals auf den Blutdruck. CO_2 erzeugte bei hypertonischen Ratten nach anfänglichem Anstieg eine Senkung der Tension. Sevenal setzte den Blutdruck weder normaler, noch hypertonischer Tiere herab.

LITERATUR

1. *Nikolajew, M. P:* Проблемы Совемской Физнол. Биох. и Фармакол. **VII**, 897 (1949).
2. *Mentova, V. N.:* Zit. Nikolajew: Учебник Фармакол. 1948.
3. *Grollmann, A.:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **57**, 102 (1944).
4. *Herr, F.:* Kísérletes Orvostud. **2**, 369 (1950).
5. *Kersten, H.* et *al.:* J. Labor. a. Clin. Med. **32**, 1090 (1947).
6. *Issekutz, B.:* Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 283 (1952).
7. *Issekutz, B.:* Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **164**, 158, 173 (1932.)
8. *Herr, F., Nádor, K., Pataky, G., Borsi, J.:* Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 447 (1953).
9. *Ogden, E., Collings, W. D., Taylor, A. N., Tripp, E.:* Texas Rep. Biol. Med. **4**, 14 (1946).
10. *Heymans, C.:* Comptes Rendus Soc. Biol. **117**, 248 (1943).
11. *Pickering, G. W.:* Clin. Sci. **5**, 229 (1944).
12. *Dumont, L.:* Arch. internat. Pharmakodyn. **77**, 226 (1948).
13. *Moss, W. G., Wakerlin, G. E.:* Am. J. Physiol. **161**, 435 (1950).
14. *Mjassnikow, A. L.:* Терап. Архив **23**, 5, 14 (1951).

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСУДОРАСШИРЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РЕНАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ

Ф. Херр, Л. Дьердь, Я. Порсас и И. Бонта

Фармакологический институт медицинского университета, Будапешт.

Резюме

Авторы сравнивали влияние различных фармаконов на кровяное давление нормальных не наркотизированных и экспериментально гипертонических крыс. Исследованные ими сосудорасширяющие вещества (папаверин, перпарин, теофиллин, дорил, иохимбин, N 239 (p Brom benzyl-mandelyl-tropinium Br)) снижают кровяное давление гипертонических животных уже маленьких дозах; у нормальных животных нетоксические дозы не повлияют на кровяное давление. В случае вератрина такая разница авторами не наблюдалась.

Иохимбин и N 239 действуют различным образом в ранний и поздний период гипертонии. В поздний период они снижают кровяное давление уже при таких дозах, которые в ранний период не оказываются эффективными.

Авторами исследовано далее влияние севенала и вдыхании CO_2 на кровяное давление. CO_2 вызывает у гипертонических крыс после начального повышения, снижение кровяного давления. Севенал не вызвал снижение кровяного давления ни у нормальных ни у гипертонических крыс.

WIRKUNG DER UMWELTTEMPERATUR AUF DIE TOXIZITÄT DER ANALGETIKA

Von

F. HERR, J. BORSI, GY. PATAKY

PHARMAKOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen: am 14. Januar 1953)

In einer früheren Arbeit (1), deren Gegenstand die Pharmakologie des Hexalgons war, ergab die Messung der Toxizität des Polamidons viel geringere Werte als die von *Chen* angegebenen Daten (2). In später wiederholten Untersuchungen fanden wir die Toxizität des Polamidons und auch die des Hexalgons grösser als in unserer früheren Mitteilung. Die erste Versuchsreihe wurde zur Winterszeit im kühlen Laboratorium, die zweite im Sommer ausgeführt, wir glaubten daher, die Unterschiede der Toxizität wären durch die Differenz der Umwelttemperatur bedingt. Bekanntlich hängt die Toxizität gewisser Verbindungen von der Temperatur der Umgebung ab (3, 4, 5, 6). *Sievers* und *McIntyre* (7) hatten festgestellt, dass Procain in warmer Umgebung (36° C) viel toxischer wirkt, als in Kälte (15° C). *Pulewka* und *Berkan* (8) bestätigten diese Ergebnisse und dehnten sie auch auf das Tutocain und Monocain aus. Sie stellten fest, dass diese Erscheinung mit den Resorptionsverhältnissen nicht erklärt werden kann. In der vorliegenden Arbeit prüften wir eingehend die Wirkung der Umwelttemperatur auf die Toxizität der Analgetika und versuchten, deren Ursache zu erforschen.

Methodik

Wir untersuchten die Toxizität von Polamidon (6-dimethylamino 4,4 diphenyl-heptan 3-on), Hexalgon (1-piperidino-3, 3-diphenylhexan-4-on. HBr), Dolantin (1-methyl-4 phenyl-piperidincarbonsäure-aethylester) und Morphin an 15—25 g schweren weissen Mäusen bei zwei solchen Umwelttemperaturen, die im Laboratorium auch unter normalen Verhältnissen möglich sind: bei 18° und 29° C. Die in Wasser gelösten Pharmaka wurden in 0,01—0,02 ml/g Flüssigkeit subkutan und in einem der Versuche intravenös eingespritz. Die Mäuse wurden zu viert in etwas Sägemehl enthaltenden grossen Glasbehältern untergebracht. Eine Stunde vor der Injektion haben wir die Tiere bei 18° C Zimmertemperatur oder im Thermostat bei 29° C gehalten und die Ergebnisse der Toxizität sechs Stunden nach der Injektion abgelesen. Die Rektaltemperatur wurde mit einen Quecksilberthermometer oder Thermoelement gemessen. Für die Bestimmung sämtlicher Dosen benutzten wir mindestens acht Mäuse und die Bewertung der Ergebnisse führten wir mit dem Verfahren von *Litchfield* und *Wilcoxon* (9) aus.

In einigen Experimenten untersuchten wir die Krampfbereitschaft von 120—150 g schweren Ratten mit einem Wechselstrom-Elektroschockapparat. Als positives Resultat wurde nur angesehen, wenn alle vier Extremitäten der Tiere in tonischen Krampfzustand gerieten.

Ergebnisse

Wir haben die mit Polamidon und Morphin bei 18, bzw. bei 29° C gewonnenen Ergebnisse in einem Koordinatensystem angegeben. (*Abb.* 1) wo die Abszisse die Dosis in mg/kg (logarithmische Einteilung), die Ordinate die Mortalität in Prozenten darstellt (Wahrscheinlichkeitsnetz) (10). Die mit Morphin in Kälte und Wärme gewonnen Toxizitätsergebnisse können mit einer einzigen Geraden zum Ausdruck gebracht werden ; das χ^2 ist bei 18°C 3.75, bei 29° C 2.92, neben drei Freiheitsgraden ; die Toxizität des Morphins ist demnach bei beiden Temperaturen dieselbe.

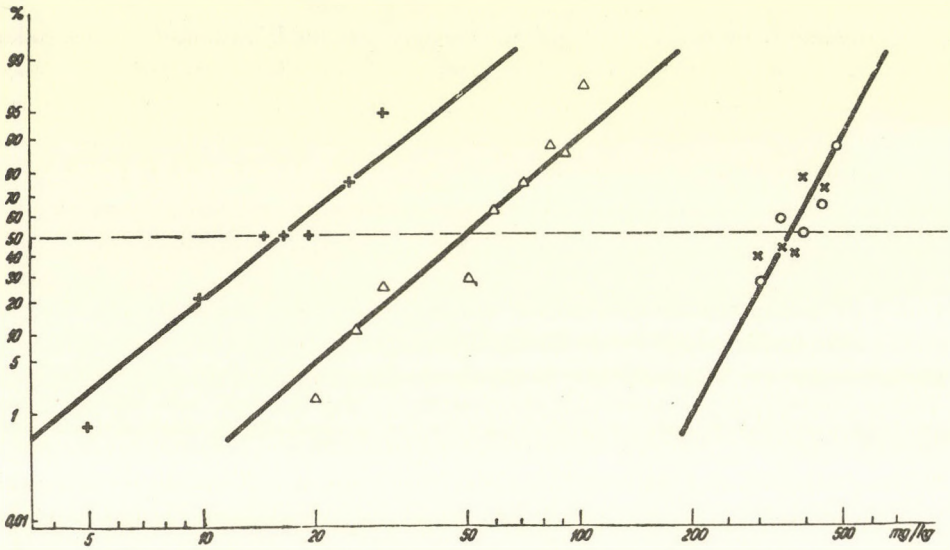


Abb. 1. Toxizität des Polamidons und Morphins bei 29° und 18° C

\+ Polamidon bei 29° C
△ Polamidon bei 18° C
○ Morphin bei 29° C
× Morphin bei 18° C

Die Zusammenfassung der Gesamtresultate ist in der Tabelle I. zu sehen. Die DL_{50} des Polamidons bei 18° C ist 49 mg/kg (die 19/20 Vertrauensgrenzen sind 39—61 mg/kg) bei 29° C 17 mg/kg (die 19/20 Vertrauensgrenzen 14—21 mg/kg). Das Mittel ist demnach in Wärme 2.88mal toxischer als in Kälte. Die DL_{50} des Morphins ist bei beiden Temperaturen dieselbe: 360 mg/kg.

Mit dem Polamidon völlig übereinstimmende Resultate erhielten wir auch mit Hexalgon und Dolantin. Hexalgon war 2.9mal, Dolantin 2.75mal toxischer in warmer Temperatur.

In unseren Forschungen betreffend die Ursache der Toxizitätsdifferenzen zwischen kalter und warmer Umwelttemperatur, verglichen wir zunächst durch

TABELLE I

Die Toxizität der Analgetika an 18° und 29° C

Pharmakon	Art. der Verabfolgung	Umwelttemp. C°	Zahl der Mäusen	DL_{50} mg/kg	19/20 Vertrauensgrenzen	Neigung (Slope)	Verhältnis der Wirkungsstärke	19/20 Vertrauensgrenzen
Polamidon ..	sc.	18	80	49	39—61	1,74	2,88	2,1—3,9
	sc.	29	64	17	14—21	1,83		
	i. v.	18	45	18	14—23	1,61	2,12	1,4—3,1
	i. v.	29	35	8,5	6,3—12	1,63		
Hexalgon ...	sc.	18	55	96	79—117	1,6	2,9	2,0—4,3
	sc.	29	52	33	24—48	1,8		
Dolantin ...	sc.	18	40	275	245—312	1,25	2,75	2,1—3,5
	sc.	29	34	100	81—124	1,37		
Morphin	sc.	18	46	360	306—424	1,31	1,0	—
	sc.	29	48	360	310—416	1,31		

intravenöse Injektion die Toxizität des Polamidons bei 18° und 29° C und fanden auch so eine 2,12fache Differenz (Tabelle I). Die Resorption spielt also keine wesentliche Rolle in der Toxizitätsdifferenz. In Bezug auf Procain und Tutocain gelangten *Pulewka* und *Berkan* auf anderem Wege zu demselben Ergebnis (8).

Da die Umwelttemperatur die Toxizität der synthetischen Analgetika in so hohem Masse beeinflusst, prüften wir in den folgenden Versuchen die Frage, welchen Einfluss diese Mittel auf die Rektaltemperatur der Tiere ausüben mögen. Wir verglichen die synthetischen Analgetika mit dem Morphin in der Weise, dass wir die temperaturherabsetzende Wirkung der DL_{50} in Kälte und Wärme untersuchten. Die mit Polamidon und Morphin gewonnenen Ergebnisse sind aus der Abbildung 2. ersichtlich. Jeder Punkt stellt den Mittelwert der Temperatur von sechs Mäusen dar. Polamidon setzte die Temperatur der in Wärme (29° C) gehaltenen Tiere kaum herab, durchschnittlich nur um 1.5° C. Dagegen wurden die in Kälte gehaltenen Tiere sehr stark abgekühlt, ihre Rektaltemperatur sank durchschnittlich auf 22° C herab, bei einem der sechs Tiere sogar auf 18.8° C. Morphin erzeugt keine so hochgradige Temperatursenkung und von den morphinbehandelten Tieren fiel nur deren Temperatur unter 34° C, die schon während ihrer toxisch bedingten Agonie sekundär abgekühlt wurden. Hexalgon und Dolantin verursachen gleich dem Polamidon bei 18° C Umwelttemperatur eine starke Temperatursenkung. Demnach, abweichend vom Morphin, verfügen die synthetischen Analgetika in toxischen Dosen in kalter Umgebung über eine sehr starke temperatursenkende Wirkung.

Procain, in dessen Toxizität die Temperatur der Umgebung (7, 8) ebenfalls eine wesentliche Rolle spielt, hat bekanntlich auch eine

temperaturerniedrigende Wirkung (11). Vergleichen wir unsere Ergebnisse mit diesen Daten, so sehen wir, dass Pharmaka, wenn sie die Temperatur der Tiere herabsetzen, weniger toxisch sind. Mäuse, die in kalter Umgebung synthetische Analgetika erhielten, kühlen sich ab, demzufolge sind diese Mittel in Kälte weniger toxisch als bei 29° C, wo keine Abkühlung erfolgt. Im Gegensatz zu den synthetischen Analgetika besitzt das Morphin, selbst in toxischer Dosis, keine wesentliche temperatursenkende Wirkung und es besteht auch keine Differenz zwischen der in warmer und kalter Umgebung gemessenen Toxizität. Unsere Annahme wird durch das experimentelle Ergebnis bestätigt,

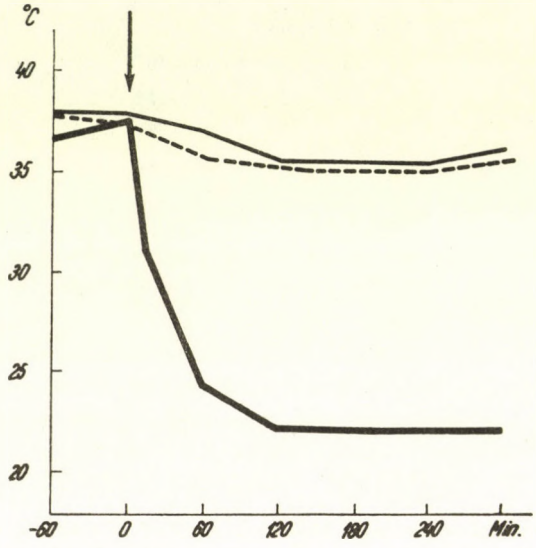


Abb. 2. Wirkung von Polamidon und Morphin auf die Körpertemperatur von Mäusen bei 18° und 29° C (Die Injektion erfolgte in der 0 Minute)
Starke Linie: Polamidon bei 18° C; dünne Linie: Polamidon bei 29° C; unterbrochene Linie: Morphin bei 18° C

dass es vom Gesichtspunkt der Toxizität belanglos ist, bei welcher Temperatur die Mäuse vor der Injektion des Pharmakons gehalten werden, entscheidend ist nur die Umwelttemperatur, in welche die Mäuse nach Verabfolgung des Pharmakons gelangen. Wenn wir die Mäuse zwei Stunden lang bei 29° C hielten, dann die bei 29° C bestimmte DL_{100} des Polamidons injizierten und nachher die Tiere auf 18° C brachten, ging nur 40% der Mäuse ein. Das Ergebnis war also dasselbe also ob wir die Tiere auch vor der Injektion in Kälte gehalten hätten. Bei umgekehrter Ausführung des Versuches hat es sich auch erwiesen, dass vom Gesichtspunkt der Toxizität nur die der Injektion folgende Aussenwelttemperatur von Bedeutung ist. Besteht also eine Möglichkeit zur Abkühlung der Tiere, so bleiben sie am Leben, wenn nicht, so gehen sie zu Grunde.

Ist ein Mittel bei starker Abkühlung des Tieres weniger toxisch als bei normaler Temperatur, so kommen unseres Erachtens zur Erklärung dieser

Erscheinung folgende Möglichkeiten in Betracht: 1. In Kälte wird das Mittel schneller eliminiert. 2. Nicht das Pharmakon selbst, sondern seine Abbauprodukte sind toxisch, wie es aus den Froschversuchen mit Colchicin bekannt ist (3). Infolge der Abkühlung dürften also diese toxischen Stoffwechselprodukte langsamer entstehen. 3. Infolge der Abkühlung wird im Organismus ein solcher Stoff frei, der das Tier von den toxischen Symptomen bewahrt. 4. Infolge der Senkung der Körpertemperatur kommen im Organismus gewisse Veränderungen zustande, wodurch das Tier den Pharmaka gegenüber weniger empfindlich wird.

Ad 1. Im Sinne des *van't Hoff*schen Gesetzes nimmt die Geschwindigkeit der chemischen Reaktionen bei 10°C Senkung der Temperatur um 50% ab, was der rascheren Eliminierung der Mittel bei 22° C Körpertemperatur widerspricht. Die Annahme einer rascheren Eliminierung wird auch durch unsere folgende Beobachtung widerlegt. Wenn wir die in Kälte gehaltenen Mäuse sechs Stunden nach Verabfolgung von 20 mg/kg Polamidon an 29° C bringen, so entwickeln sich nach der Erwärmung an den bisher völlig bewegungslosen Tieren maximal die für die Analgetika charakteristische Erregung und Schwanzreaktion. Dagegen ist an Tieren, welche die gleiche Dosis erhielten und in Wärme gehalten wurden, — wenn sie am Leben bleiben, — nach so langer Zeit schon keine für das Polamidon charakteristische Wirkung zu beobachten. Demnach wird das Polamidon bei 22° C Körpertemperatur noch langsamer eliminiert als bei normaler Temperatur.

Ad 2. Gegen die Annahme, dass die synthetischen Analgetika — ähnlich dem Colchicin — nicht selbst, sondern nur ihre Abbauprodukte toxisch wären, spricht mit grosser Wahrscheinlichkeit der Umstand, dass zwischen der am Frosch und an der Maus gemessenen Toxizität des Polamidons keine so grosse Differenz besteht wie beim Colchicin. Colchicin wirkt an der Maus 400mal toxischer als am Frosch (3), während bei Polamidon die Differenz gleich dem Morphin nur eine dreifache ist (2). Auch das im 4. Punkt zu erörternde Verhalten der Mäuse in kalter Umgebung spricht gegen die obige Annahme.

Ad 3. Bekanntlich wird durch die Wirkung der Abkühlung Adrenalin aus den Nebennieren befreit. Ausserdem hat *Selye* (12) festgestellt, dass die Abkühlung eine ACTH-Mobilisierung verursacht. Es war anzunehmen, dass diese Stoffe in Kälte der toxischen Wirkung der Analgetika entgegenwirken. Nach unseren Versuchen zeigte aber weder Adrenalin (15 Minuten vor der Injektion 2 μg pro Maus i. p. dreimal pro 15 Minuten) noch ACTH (2 mg pro Maus, 30 Minuten vor dem Analgetikum) bei 29° C irgend eine Schutzwirkung gegenüber der Toxizität des Polamidons.

Ad 4. Im Verhalten der in Kälte und Wärme gehaltenen Mäuse ist ein wesentlicher Unterschied bemerkbar. An den in Wärme gehaltenen Tieren entwickelt sich kurz nach der Injektion Erregung und Schwanzreaktion und die Tiere gehen unter Krämpfen zu Grunde. Dagegen sind die abgekühlten Mäuse beinahe bewegungslos, ihre Schwanzreaktion ist minimal und Krämpfe ent-

wickeln sich ebenfalls nicht. Die letztere Beobachtung regte uns an, Untersuchungen zur Bestimmung der Elektroschock-Reizschwelle auszuführen. Wir injizierten zehn bei 18° C gehaltene Ratten subkutan 20 mg/kg Polamidon und verglichen zwei Stunden später ihre Elektroschock-Reizschwelle mit der von zehn ähnlich behandelten in 29° C gehaltenen Ratten. Ausserdem untersuchten wir die Polamidonwirkung auf die Körpertemperatur bei den zwei verschiedenen Umwelttemperaturen.

Die durchschnittliche Temperatur der in Kälte gehaltenen Ratten fiel von 36.8° auf 27.4° C, der in Wärme gehaltenen Ratten von 37.4° auf 36.6° C. Von den letzteren gingen zwei binnen einer Stunde nach der Injektion ein. Ohne nähere Untersuchung dieser Frage glauben wir schon auf Grund dieser Ergebnisse feststellen zu können, dass unsere bezüglich der Toxizität an Mäusen gemachten Beobachtungen auch für Ratten gültig sind. Zwei Stunden nach Verabfolgung des Polamidons löste ein elektrischer Strom von 70 V Spannung und 16 mA Stärke an drei von zehn abgekühlten Ratten Krämpfe aus, unter den warmen Ratten dagegen nur an einem einzigen von acht Tieren. Die gleiche Stromstärke löste in 80% der unbehandelten Ratten Krämpfe aus. Dieses Ergebnis weist jedenfalls darauf hin, dass die Krampfbereitschaft der abgekühlten Tiere (dem Elektroschock gegenüber) nicht vermindert, sondern eher noch erhöht sein dürfte. Nach den Angaben von *Swinyard* und *Toman* (13) nimmt die Krampfbereitschaft gegenüber Elektroschock und Tetracor ebenfalls mit dem Fall der Körpertemperatur zu. Nach unseren Beobachtungen verursachen die synthetischen Analgetika keine Krämpfe an den in Kälte gehaltenen Mäusen. Die natürlichste Erklärung dieser Tatsache besteht darin, dass die Pharmaka nicht zu ihrem Angriffspunkt im Zentralnervensystem gelangen.

Die charakteristische Wirkung der Analgetika besteht in der Betäubung des Respirationszentrums. Man könnte annehmen, dass diese Mittel in kalter Umgebung deshalb weniger toxisch wären, weil die abgekühlten Mäuse zur Erhaltung ihres geringen Stoffwechsels selbst bei ihrer herabgesetzten Atmung genügend mit Oxygen versorgt werden Dagegen wird der Oxygenbedarf der in Wärme gehaltenen Mäuse durch die verminderte Atmung nicht gedeckt und die Tiere gehen an Erstickungstod zu Grunde. Das Polamidon wirkt aber bei 29° C in etwa 80% Oxygen enthaltender Luft noch toxischer als in normaler Luft, weil 20 mg/kg (DL_{60}) alle auf diese Weise behandelten acht Mäuse getötet hat. Hieraus folgt, dass die tödliche Wirkung der synthetischen Analgetika auf die Mäuse nicht durch Oxygenmangel bedingt ist.

Besprechung der Ergebnisse

Die Toxizität des Morphins ist bei 18° und 29° C die gleiche, die der synthetischen Analgetika ist aber bei 18° C viel geringer ; auffallend ist, dass diese Differenz für alle drei Mittel beinahe völlig dieselbe ist: bei Polamidon 2.88,

Hexalgon 2.9, Dolantin 2.75. Bei intravenöser Injektion erhielten wir eine Differenz ähnlicher Grössenordnung, was dafür spricht, dass die Ursache dieser Differenz nicht in den verschiedenen Resorptionsverhältnissen liegt. Die mit synthetischen Analgetika behandelten Mäuse kühlen sich in kalter Umgebung stark ab, die mit Morphin behandelten hingegen nicht. Unserer Meinung nach werden die Mäuse durch diese Abkühlung in der Kälte von den in Wärme bereits toxischen Dosen geschützt. Beim Morphin, wo es keine Temperatursenkung gibt, besteht auch kein Unterschied zwischen der in Wärme und Kälte gemessenen Toxizität. Die geringere Toxizität in Kälte kann weder durch das infolge der Abkühlung freigewordene ACTH (über Cortison), noch durch das Adrenalin erklärt werden, weil keines von beiden der toxischen Wirkung des Polamidons in Wärme entgegenwirkt. Wir halten es nicht für wahrscheinlich, dass eventuell ein anderer im Organismus freigewordener Stoff die Toxizität der synthetischen Analgetika in so hohem Masse neutralisieren würde. Nach unseren Beobachtungen ist die Eliminierung bei 18° C geringer als bei 29° C. Die Tatsache, dass die Toxizität in Kälte trotzdem geringer ist als in Wärme, wäre unseres Erachtens damit zu erklären, dass weniger Moleküle in die Zellen, und zwar hauptsächlich in die Zellen des Zentralnervensystems gelangen, wo diese Pharmaka ihre toxische Wirkung entfalten. Die Verminderung der Zellwandpermeabilität kann mit der Abkühlung gut erklärt werden. Der Zustand der die Zellwand bildenden Lipoide dürfte durch die 15—18° C-ige Abkühlung eine Änderung erleiden. Die Aktivität der in der Zellwand enthaltenen Enzyme nimmt bei einer derartig starken Senkung der Körpertemperatur ebenfalls ab. Die synthetischen Analgetika rufen schon nach subkutaner Verabfolgung binnen 15 Minuten einen starken Temperaturfall hervor und vermutlich wird das Tier durch diese Abkühlung mit der konsekutiven Verminderung der Permeabilität von der Toxizität bewahrt. *McDonald*, der die Toxizität vom *BAL* an Ratten geprüft hat, fand, dass die Toxizität dieses Mittels bei 17.2° C am geringsten ist, und dass sie sowohl bei Erhöhung als bei Herabsetzung der Umwelttemperatur steigt (6). Nach unseren Untersuchungen erzeugt auch das *BAL* eine starke Temperatursenkung und unserer Ansicht nach liegt die Erklärung für die Beobachtungen *McDonald*'s darin, dass die Abkühlung der Tiere unter einen gewissen Grad allein den Tod herbeizuführen vermag. Auch wir machten die Erfahrung, dass die Mäuse bei einer Umwelttemperatur unter 18° C sich so stark abkühlen, dass sie bei Verbleiben an dieser Temperatur 10—20 Stunden nach der Injektion eingehen. Wenn sie aber 5—6 Stunden nach der Injektion in warme Umgebung gebracht werden, so wärmen sie sich auf und bleiben am Leben.

Unsere Versuche führten uns zu folgenden Schlüssen: 1. Es wäre zweckmässig anzugeben, an welcher äusseren Temperatur die Messung der Toxizität ausgeführt wurde. Dies dürfte sicherlich zur Übereinstimmung der in den verschiedenen Laboratorien gewonnenen Ergebnisse beitragen. 2. Diese Ergebnisse dürften eventuell bei Analgetikumvergiftungen therapeutisch verwertbar sein

in dem Sinne, dass man die Vergifteten statt sie dauernd in warmer Umgebung zu halten, behutsam abkühlen lässt. Vor eventuellen schädlichen Wirkungen der Abkühlung könnte man den Organismus durch prophylaktische Verabfolgung von Antibiotika schützen.

Zusammenfassung

Es wurde an Mäusen gefunden, dass die Toxizität des Polamidons, Hexalgons und Dolantins bei 18° C in der Reihenfolge der genannten Pharmaka 2.88mal, 2.9mal, 2.75mal geringer ist als bei 29° C. Die Toxizität des Morphins ist an beiden Temperaturen dieselbe.

2. Polamidon ist intravenös verabfolgt 2.1mal toxischer bei 29° C als bei 18° C.

3. Die synthetischen Analgetika verursachen bei 18° C eine starke Senkung der Körpertemperatur. Die Temperatur der Mäuse fiel im Durchschnitt auf 22° C herab. Dagegen wurde sie durch Morphin nur ganz unbedeutend vermindert.

4. Nach unserer Annahme ist die an 18° C Umwelttemperatur gemessene Temperatur deshalb niedriger, weil die Zellenpermeabilität infolge der starken Abkühlung der Tiere wesentlich abnimmt, demzufolge die Pharmaka nicht in grösserer Menge zu ihrem Angriffspunkt gelangen.

5. Es wird vorgeschlagen, bei Mitteilung der Toxizitätsergebnisse immer anzugeben, bei welcher Temperatur die Bestimmung ausgeführt wurde. Es wird die Frage der therapeutischen Verwendungsmöglichkeit unserer Ergebnisse in Vergiftungsfällen aufgeworfen.

LITERATUR

1. *Herr, F., Pórszász, J.:* Arch. exper. Path. u. Pharm. **210,** 294 (1950).
2. *Chen, K. K.:* Ann. New York Acad. Sci. **51,** 83 (1948).
3. *Fühner, H., Breipohl, W.:* Arch. exper. Path. u. Pharm. **173,** 146 (1933).
4. *Wokes, F.:* Quart. J. Pharm. a. Pharmacol. **8,** 34 (1935).
5. *Meyer, B. J., Karel, L.:* J. Pharmacol. exper. Ther. **93,** 420 (1948).
6. *McDonald, F. F.:* Brit. J. Pharmacol. **3,** 116 (1948).
7. *Sievers, R. F., McIntyre, A. R.:* J. Pharmacol. exper. Ther. **59,** 90 (1937).
8. *Pulewka, P., Berkan, D.:* Arch. exper. Path. u. Pharm. **216,** 168 (1952).
9. *Litchfield, J. T. Jr., Wilcoxon, F.:* J. Pharmacol. exper. Ther. **96,** 99 (1949).
10. *Prigge, R., Schäfer, W.:* Arch exper. Path. u. Pharm. **191,** 281 (1939).
11. *Glaubach, S., Pick, E. P.:* Arch. exper. Path. u. Pharm. **162,** 537 (1931).
12. *Selye, H.:* Canad. M. A. J. **34,** 706 (1936).
13. *Swinyard, E. A., Toman, J. E. P.:* Am. J. Physiol. **154,** 207 (1948).

ВЛИЯНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ТОКСИЧНОСТЬ БОЛЕУТОЛЯЮЩИХ СРЕДСТВ

Ф. Херр, Я. Борши, Д. Патаки

Фармакологический институт медицинского университета, г. Будапешт

Резюме

1. Авторами установлено, что при температуре в 18° С токсичность поламидона в 2,88 раза, гексалгона в 2,9 раза и долантина в 2,75 раза меньше, чем при температуре в 19° С. Токсичность морфина одинакова при обеих температурах.

2. Внутривенно введенный поламидон является при температуре в 29° С в 2,1 раза более токсическим, чем при температуре в 18° С.

3 При внешней температуре в 18° С синтетические болеутоляющие средства вызывают сильное снижение температуры тела. Температура тела мышей в общем снижается до 22° С. По сравнению с этими болеутоляющими средствами, температура тела морфином почти что не снизилась.

4. По предположению авторов, измеренная при внешней температуре в 18° С токсичность оказывается более низкой из-за того, что вследствие сильного охлаждения животных, проницаемость клеток значительно уменьшается, и поэтому средствы не попадают в большом количестве на точку приложения.

5. Авторами предложено, при приведении результатов токсичности всегда указывать температуру, при которой производилось определение. Они выдвинули возможность использования своих результатов в терапии, в случае отравлений.

NEUE METHODE ZUR MESSUNG DER LOKOMOTORISCHEN REAKTION VON VERSUCHSTIEREN

(UNTERSUCHUNGEN MIT AKTEDRON)

Von

E. KOMLÓS, I. KNOLL, L. TARDOS, V. SZÁSZ

PHARMAKOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen: am 3. Oktober 1952.)

Die quantitative Messung der Wirkung zentraler Erregungs- und Beruhigungsmittel, sowie der motorischen Aktivität von Versuchstieren, fand bisher keine befriedigende Lösung. Die Messung der lokomotorischen Reaktion geschieht im allgemeinen auf zweierlei Art:

1. Mittels Drehtrommeln, welche durch die Bewegung des Tieres zum Drehen gebracht werden (1, 2, 3, 4).

2. Mit den sog. Aktographen, die im wesentlichen auf leichte Feder suspendierte oder auf solche sich stützende Käfige sind (5, 6, 7, 8).

Von beiden Methoden ist eine Unmenge von Varianten und Modifikationen bekannt. Diejenigen Drehtrommelsysteme, welche den Erforderungen entsprechen, sind äusserst komplizierte und kostspielige Einrichtungen und nur in solchen Fällen mit Erfolg anwendbar, wo die motorische Aktivität des Versuchstieres längere Zeit (Tage, Wochen) hindurch beobachtet werden muss. Zur Messung kürzerer lokomotorischer Reaktionen sind im allgemeinen die Aktographe brauchbarer, welche bei Anwendung von Käfigen mit entsprechend gewähltem Gewicht und Federn entsprechender Elastizität derart empfindlich konstruiert werden können, dass sie die feinsten Säuberungsbewegungen der Mäuse und sogar ihre Herztätigkeit zu registrieren vermögen. Die Registrierung der Bewegung mit Aktographen ist auf zweierlei Art üblich:

1. Der Käfig schliesst bei seiner Verschiebung einen elektrischen Stromkreis.

2. Der Käfig ist durch irgend eine Umschaltung mit einem Schreibhebel verbunden, der die Verschiebungen auf einen Kymographen aufzeichnet.

Im ersten Fall wird, ohne Rücksicht auf die Amplitudo der Bewegung, nur deren Frequenz berechnet, im zweiten Fall kommt, ausser der Frequenz, auch die Amplitudo zur Registrierung. Prinzipiell wäre also die zweite Registrierungsmethode für die quantitative Messung der lokomotorischen Reaktionen geeignet, jedoch begnügt sich die Mehrzahl der mit dieser Methode arbeitenden Autoren mit den qualitativen Ergebnissen, da die zahlenmässige Auswertung der Kurven in den meisten Fällen unmöglich oder wenigstens sehr zeitraubend ist.

Forst (9) gab eine einfache Methode zur Messung der lokomotorischen Reaktion von Mäusen an. Die Methode besteht darin, dass das Tier während seiner Bewegung den Russ von einem untergelegten berussten Papierblatt abwischt. Diese Methode ist aber zur genauen quantitativen Messung nicht geeignet.

J. Aschoff (10) hat in 1951. eine neue Registrierungstechnik beschrieben. In dem von ihm konstruierten Apparat wird durch die Bewegung des Zitterkäfigs eine Scheibe zur gleichgerichteten Drehung gebracht und die Zahl der Scheibendrehungen gibt die Grösse der Bewegung an. Diese Methodik ist besonders in länger dauernden Versuchen (spontane Bewegung) mit gutem Erfolg brauchbar.

Uns gelang es eine Registrierungsmethode zu finden, die sehr einfach, billig, überaus empfindlich ist und gut reproduzierbare quantitative Ergebnisse liefert.

Methodik

Wir montierten an den Boden des auf eine Feder suspendierten Zitterkäfigs (Abb. 1 »a«) eine mit seitlichem Ausführungsrohr versehene, nach unten gedrehte Glasglocke (b), deren Rand in ein wassergefülltes Gefäss (c) taucht. Bei Bewegung des Zitterkäfigs nach unten wird infolge der Senkung der Glocke durch das Ausführungsrohr Luft von der Glocke ausgepresst. Die Luft wird durch ein Glasrohr (d) in eine mit Wasser gefüllte, oben geschlossene, unten mit einem Ausflussrohr versehene Deville-Flasche geleitet, woraus das Wasser in einer dem Luftvolumen entsprechenden Menge ausgepresst und in einem Messzylinder aufgefangen wird. Durch genaue Einstellung des unteren Randes des mit »d« bezeichneten Glasrohres und des oberen Randes des Ausflussrohres (e) in dasselbe Niveau, können wir erreichen, dass durch die geringste Bewegung des Zitterkäfigs Luft, bzw. Wasser vom System ausgepresst wird. Liegt das untere Ende des »d« Rohres tiefer, so fliesst das Wasser nur bei beträchtlichem Überdruck oder bei grösserer Verschiebung des Zitterkäfigs vom System heraus, das letztere wird also weniger empfindlich. Liegt dagegen das »e« Rohr tiefer, so fliesst das Wasser spontan, ohne jede Bewegung des Zitterkäfigs von der Deville-Flasche heraus. Auf diese Weise ist die Empfindlichkeit des Systems unschwer zu regulieren. Um einen konstanten, und zwar dem äusseren Luftdruck gleichen Druck im System aufrecht zu halten, d. h. die von der Glocke ausgepresste Luft zu ersetzen, haben wir ein sehr empfindliches Wasserventil (f) in das System geschaltet, wodurch die Entfernung der Luft verhindert, andererseits ihre Einströmung beim geringsten negativen Druck, wo die Feder den Zitterkäfig in ihre ursprüngliche Lage zurückzieht, praktisch ohne jeden Widerstand ermöglicht wird.

Die Empfindlichkeit dieses Systems ist abhängig von der Empfindlichkeit der Feder, vom Gewicht des Käfigs, von der entsprechenden Einstellung der »e« und »d« Röhren und von der genauen Einstellung des Wasserventils. Die Zunahme des Glockendurchmessers steigert infolge Verminderung der Reibung ebenfalls die Empfindlichkeit des Systems. Bei richtiger Auswahl dieser Faktoren dürfte die Methodik auch zur genauen Registrierung der lokomotorischen Reaktionen einer Maus genügend empfindlich gemacht werden.

Die wichtigsten Daten des in unseren Versuchen verwendeten Systems sind die folgenden: Länge der Feder = 33 cm, ihre Dicke = 2 mm, ihre Verlängerung auf 1 kg Belastung = 18 cm, Gewicht des Käfigs, die Glocke inbegriffen: 810 gm, Durchmesser der Glocke = 6 cm, Durchmesser des »d« Rohrs = 5 mm, Durchmesser des »e« Rohrs = 15 mm. Wir führten unsere Versuche bei diesen Konstanten bei Zimmertemperatur aus und sperrten in den Käfig auf einmal 4 Ratten von 150—200 g Gewicht, oder 20 Mäuse von je 18—25 g ein. Wir müssen bemerken, dass selbst bei gleichen Versuchseinrichtungen quantitativ vergleichbare Ergebnisse natürlich nur im Falle von Verwendung ungefähr gleich schwerer Tiere zu erzielen sind.

Der Gang der Versuche war der folgende:

Nach Einsperren der Tiere in den Käfig nahmen wir 30 Minuten lang keine Messungen vor; nach unseren Erfahrungen benötigten nähmlich die Tiere diese Zeit, um sich in den ihnen

ungewohnten Verhältnissen zu beruhigen. Nach Ablauf dieser Zeit legten sich die Tiere in der Mehrzahl der Fälle in der einen Ecke des Käfigs nieder und schliefen ein. Erst dann wurde mit den Messungen begonnen. Die Menge des ausfliessenden Wassers wurde alle zehn Minuten gemessen und die Messungen wurden sechsmal nacheinander wiederholt. Die in den Tabellen dargestellten Werte zeigen immer die Summe der sechs Messungen, d. h. die Gesamtmenge des während einer Stunde ausgepressten Wassers in ml. Wenn wir den Tieren irgend ein Arzneimittel verabreichen wollten, so nahmen wir sie aus dem Käfig heraus, führten die Injektion oder Sondierung aus und brachten sie in den Käfig zurück. Dann genügte schon eine Gewöhnungszeit von 10 Minuten, da sich die Tiere nach ihrem Zurückbringen in den Käfig früher beruhigten. So fingen wir nach 10 Minuten mit den Messungen an und setzten diese über eine Stunde fort. Die Injek-

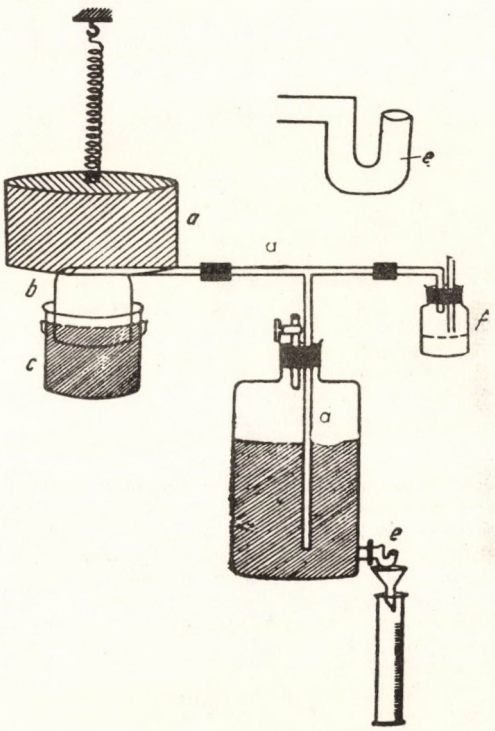


Abb. 1

tion verursachte keine langdauernde Erregung der Tiere, da sie nach subkutaner Injektion von physiologischer Kochsalzlösung und nach ihrem Zurückbringen in den Käfig keinerlei Zeichen von Erregung zeigten.

Da wir unsere Methodik zur Untersuchung der Wirkung von Pharmaka benützen wollten, harrte die Frage der Entscheidung, ob ein Zusammenhang zwischen der spontanen Aktivität der Tiere und der Grösse der auf die Wirkung der Pharmaka auftretenden motorischen Reaktionen bestehe. Sollte ein derartiger Zusammenhang bestehen, so müsste man die Wirkung der Pharmaka im Verhältnis zur spontanen Aktivität prozentuell bewerten. Unsere Versuche lieferten aber keinen Beweis für das Vorhandensein eines Zusammenhanges ; die Grösse der durch das untersuchte Pharmakon ausgelösten motorischen Reaktion ist demnach unabhängig von der spontanen Beweglichkeit der Tiere (Tablle I). Demzufolge haben wir später, als wir schon über genügende Erfahrung verfügten, den Gang unserer Versuche in der Weise modifiziert. dass die Tiere zwecks Angewöhnung 30 Minuten lang in den Zitterkäfig gesperrt, dann ohne den Ruhewert zu messen vom Käfig herausgenommen wurden. Nach Verabfolgung des zu untersuchenden Mittels haben wir die Tiere in den Käfig zurückgebracht, nach 10 Minuten Wartezeit

TABELLE I

Zusammenhang der durch Aktedron verursachten motorischen Erregung mit der spontanen Aktivität

Dosis des Aktedrons in mg/kg	Ruhewert	Erregungswert
1,0	86	1585
1,0	172	890
1,0	24	820
1,0	90	752
1,0	250	827
3,0	287	2715
3,0	142	3540
3,0	78	2835
3,0	132	2707
3,0	177	3260
4,0	34	4680
4,0	240	3800
4,0	238	4700
4,0	59	3830
4,0	29	3800
	136 ± 85	

die Messung begonnen und diese über eine Stunde fortgesetzt. In den Tabellen ist die Menge des entleerten Wassers, ohne ihr Verhältnis zum Ruhewert, in ml angegeben. Wie aus Tabelle I ersichtlich, beträgt der Ruhewert bei der Ratte 136 ± 85 ml, bei der Maus 177 ± 83 ml.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden in physiologischem NaCl auf die Weise aufgelöst, dass die Ratten pro 100 g Körpergewicht 0,1 ml, die Mäuse pro 1 g Körpergewicht 0,01 ml Flüssigkeit erhielten. Das peroral verabfolgte Paraldehyd und Chloralhydrat wurde so hergestellt, dass die Ratten pro 100 g Körpergewicht 2 ml Flüssigkeit bekamen.

Ergebnisse

Wir untersuchten, inwiefern unsere Methodik zur Messung der lokomotorischen Wirkung eines bekannten zentralen Erregungsmittels, des Aktedrons (Phenyl β-isopropylamin) geeignet sei.

Die Ergebnisse wurden in Tabellen zusammengestellt. Aus Tabelle II und Abbildung 2 ist zu ersehen, dass mit unserer Methodik von Aktedron eine solche Dosiswirkungskurve von 0,5 mg/kg bis 5,0 mg/kg aufgenommen werden konnte, die in diesem Abschnitt gradlinig verläuft. Jede Dosis wurde fünfmal an vier Ratten geprüft, die Mittelwerte der einzelnen Beobachtungen und auch die quadratische Abweichung berechnet. Zwischen den Nachbardosen war mit Ausnahme von 0,5 mg/kg und 1,0 mg/kg überall eine signifikante Differenz nachzuweisen. Die Gleichung der Dosiswirkungskurve des Aktedrons ist unter unseren Bedingungen : $y = 1000\,x$ und der Korrelationskoeffizient der-

selben 0,909 ± 0,035. Über 5 mg/kg wird die Kurve parabolisch. An diesem Abschnitt konnten wir schon zwischen den einzelnen Dosen keinen Unterschied beobachten.

Im folgenden untersuchten wir die Frage, in welcher Weise der durch Aktedron ausgelöste Bewegungszwang durch verschiedene Hypnotika und Sedativa

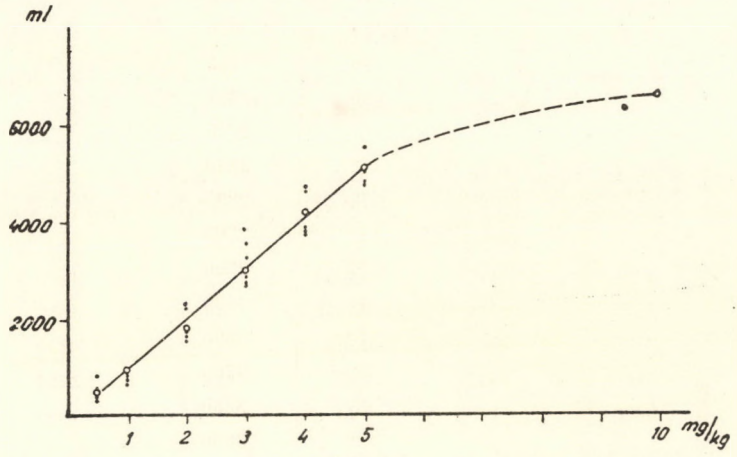


Abb. 2

TABELLE II

Wirkung der steigenden Dosen vom Aktedron auf die lokomotorische Reaktion der Ratten

Dosis des Aktedrons	0,5 mg/kg	1,0 mg/kg	2,0 mg/kg	3,0 mg/kg	4,0 mg/kg	5,0 mg/kg	10,0 mg/kg
	345	1585	1815	2715	4700	4772	6595
Menge des in einer	560	890	2300	3540	3830	5480	7880
Stunde ausgepress-	450	820	2260	2835	3800	5030	5750
ten Wassers in ml	368	752	1680	2707	3800	5130	5930
	878	827	1795	3260	4680	4810	6780
Mittelwert	520±195	975±309	1970±258	3011±332	4162±431	5044±255	6587±788
Signifikante Differenz	2,48	4,95	4,95	4,23	3,56		

beeinflusst wird. Sevenalnatrium, Urethan, Morphin-Skopolamin und NaB verabfolgten wir in subkutaner Injektion, Paraldehyd und Chloralhydrat durch Magensonde. Die Wirkung der Hypnotika und Sedativa untersuchten wir immer gegenüber zwei Aktedrondosen (2 mg/kg und 5 mg/kg). Wir verabfolgten jedesmal die sicher narkotische Dosis der Hypnotika; die Dosis des Paraldehyds

erreichte sogar fast die DL/100 ; NaBr wurde in 1,0 g/kg, bzw. 2,0 g/kg Dosen gegeben. Die Hypnotika verabfolgten wir immer 30 Minuten vor dem Aktedron wo die hypnotische Wirkung schon zur voller Entwicklung gekommen war Überdies berücksichtigten wir bei jedem Hypnotikum, ob die angewandte Dosis nicht an und für sich eine motorische Erregung erzeuge. Unsere diesbezüglichen Ergebnisse sind in Tabelle III dargestellt.

TABELLE III

Wirkung verschiedener Hypnotika auf die lokomotorische Reaktion des Aktedrons
Wirkung von 2.0 mg/kg Aktedron

Allein	Nach 100,0 mg/kg Sevenal Na	Nach 0,85 mg/kg Urethan	Nach 1,8 g/kg Paraldehyd	Nach 2,0 g/kg NaBr	Nach 1,2 g/kg Chloralhydrat	Nach 20,0 mg/kg Morphin und 1,2 mg/kg Skopolamin
1815	1348	475	1505	1230	1650	—
2300	1595	715	1605	1345	1320	—
2260	2105	585	1765	1505	2340	—
1680	2960	690	1575	1547	2280	—
1795	2260	480	1935	1935	1950	—
1970±258	2053±528	589±109	1677±154	1364±141	1908±400	—
Wirkung von 5,0 mg/kg Aktedron						
4772	5845	1370	4335	5230	—	15
5480	3320	1460	3410	4520	—	45
5030	4960	515	5200	4290	—	30
5130	5580	950	5050	3410	—	15
4810	4295	2290	3770	4920	—	15
5044±255	4810±913	1319±590	4350±625	4474±625	—	24±12

Aus Tabelle III ist ersichtlich, dass die lokomotorische Aktedronwirkung nur durch Urethan mit Sicherheit herabgesetzt werden konnte. NaBr in hohen Dosen vermindert noch die motorische Wirkung von 2.0 mg/kg Aktedron, aber gegen 5,0 mg/kg Aktedron wirkt es nur unsicher. Die gleiche unsichere Wirkung hat auch das Paraldehyd in den angewandten enorm hohen Dosen, während Sevenal und Chloralhydrat die durch Aktedron bewirkte motorische Erregung überhaupt nicht vermindern. Dagegen konnte die untersuchte Aktedronwirkung durch eine Morphin-Skopolamin Kombination schon in sehr kleinen Dosen vollständig verhindert werden ; in diesen Fällen war der durch die Morphin-Skopolaminwirkung erzeugte kataläptische Zustand so hochgradig, dass de Tiere sich auf Aktedron nicht einmal rührten. Es muss aber bemerkt werden, dass wir bei der dreifachen Kombination von Morphin-Skopolamin-

Aktedron eine sehr starke Toxizitätssteigerung beobachteten, über die wir an anderer Stelle berichten werden.

Die äussere Erscheinungsform der durch Aktedron verursachten motorischen Erregung wurde auch von jenen hypnotischen Mitteln beeinflusst, die nach unseren Untersuchungen auf das Mass der Erregung keinen Einfluss ausübten. Das bezieht sich vor allem auf unsere mit Sevenal behandelten Tiere. Diese Tiere bewegten sich auf die Aktedronwirkung viel inkoordinierter, als normale Ratten. Unsere Messungen lieferten aber den Beweis gerade dafür, dass in dem Masse, wie die Bewegung eines solchen Tieres an Frequenz einbüsst, die Amplitudo der Bewegung zunimmt. Nach unseren Beobachtungen wurde nämlich die Verminderung der Frequenz weniger durch die Steigerung der passiven Bewegungen (Hinfallen) kompensiert, als durch die Substituierung der feinen, kleinen Bewegungen durch Bewegungen von grösserer Amplitudo.

Schliesslich untersuchten wir, ob unsere Methodik, ohne jede Änderung der Versuchsbedingungen, auch für Mäuse anwendbar sei. Zu diesem Zweck sperrten wir 20 Mäuse zu je 18—25 g in den Käfig; im übrigen war der Gang der Untersuchung der gleiche, wie bei den Ratten.

TABELLE IV

Lokomotorische Wirkung des Aktedrons auf Mäuse

Dosis des Aktedrons in mg/kg	Ruhewert	Erregungswert
2,0	160	1080
2,0	175	1620
2,0	120	1415
2,0	60	1545
2,0	140	1600
		1452±199
5,0	170	1930
5,0	110	2150
5,0	210	2540
5,0	220	2370
5,0	410	2150
	177±89	2228±209

Eine Dosiswirkungskurve wurde nicht aufgenommen, nur die Wirkung von 2.0 mg/kg und 5,0 mg/kg Aktedron untersucht. Unsere Ergebnisse sind aus Tabelle IV ersichtlich.

Besprechung der Ergebnisse

Unsere Versuchsergebnisse zeigen, dass die beschriebene Methode zur quantitativen Messung der durch irgend ein Pharmakon ausgelösten lokomotorischen Reaktion gut geeignet ist.

An Hand der Untersuchung über den zwischen den Narkotika und dem Aktedron bestehenden Antagonismus erhielten wir einige unerwartete Ergebnisse. Dieser Antagonismus wird in einer Reihe von Mitteilungen behandelt (11—21), die Untersuchungen bezogen sich aber vorwiegend auf die Narkose. Die antinarkotische Wirkung des Aktedrons wurde auch von uns — mit Ausnahme der Morphin-Skopolamin Kombination — in Verbindung mit allen in unseren Versuchen verwendeten Narkotika beobachtet. Mit unserer Methodik haben wir aber nicht diese Wirkung, sondern die antilokomotorische Wirkung der Narkotika gemessen und festgestellt, dass, während die antinarkotische Wirkung des Aktedrons sämtlichen narkotischen Mitteln gegenüber zur Geltung kommt, über eine ausgesprochene antilokomotorische Wirkung dem Aktedron gegenüber nur das Urethan verfügt. Dagegen sind in dieser Beziehung Paraldehyd, Sevenal, Chloralhydrat und NaBr kaum, oder überhaupt nicht als Antagonisten des Aktedrons zu bezeichnen.

Bei der Bewertung unserer Versuche könnte man mit dem Gegenbeweis argumentieren, dass der durch das Aktedron ausgelöste Bewegungszwang von den verschiedenen Hypnotika deshalb nicht in gleicher Weise beeinflusst wird, weil die Tiefe des durch die angewandten hypnotischen Dosen erzeugten Schlafes nicht gleich ist. In diesem Zusammenhang müssen wir darauf hinweisen, das wir vom Sevenal die volle hypnotische Dosis, vom Paraldehyd und Chloralhydrat aber viel höhere, beinahe sicher tödlich wirkende Dosen verabfolgten, trotzdem hatten diese überhaupt keinen oder nur geringen Einfluss auf die lokomotorische Wirkung. Dagegen erzeugte die angewandte Dosis des in dieser Hinsicht sich als wirksam erwiesene Urethans nur oberflächlichen Schlaf, eher eine Betäubung. Andere Hypnotika in so geringer, nur oberflächlichen Schlaf erzeugender Dosis angewandt, konnten die den Bewegungszwang auslösende Wirkung des Aktedrons nicht verwehren. Nach diesen Erfahrungen müssen wir annehmen, dass die lokomotorische und antinarkotische Wirkung des Aktedron an zwei von einander isolierten Angriffspunkten zustande kommt.

Reifenstein (17) hat beim Studium des Antagonismus zwischen Alkohol und Aktedron nachgewiesen, dass das Aktedron die narkotische Wirkung des Alkohols verhindert und seine Toxizität herabsetzt, während Alkohol die Toxizität des Aktedrons erheblich steigert. Wir beobachteten bei den Morphin-Skopolamin-Aktedron-Gemischen bezüglich der Toxizität einen ganz ausserordentlich starken potenzierenden Synergismus, gleichzeitig war gerade das Morphin-Skopolamin-Gemisch der stärkste Antagonist der lokomotorischen Aktedronwirkung.

Der Antagonismus zwischen den Narkotika und den zentralen Erregungsmitteln ist also keineswegs eine Erscheinung, die sich auf sämtliche Wirkungen dieser Mittel bezieht. Ähnliche Folgerungen können wir aus den Angaben von *Herken* und seinen Mitarbeitern, bezüglich des Cardiazols ziehen, die bewiesen hatten, dass das Hexachlorcyclohexan, dessen Angriffspunkt sicher im Zentralnervensystem liegt, die krampferzeugende Wirkung des Cardiazols verhindert, aber die antinarkotische und EEG Wirkung nicht beeinflusst (22).

Unsere Versuche liefern ein weiteres Beispiel dafür, dass die Untersuchung des zwischen den Arzneimitteln bestehendem Antagonismus und Synergismus, welche eines der wichtigsten Mittel zur Erforschung der Wirkungsmechanismen ist, umso erfolgreicher sein wird, je mehr Wirkungen mit der quantitativen Methode gemessen werden können.

Zusammenfassung

1. Es wurde eine einfache, billige, empfindliche Registrierungstechnik beschrieben, die gut reproduzierbare Resultate zur quantitativen Messung der lokomotorischen Wirkung zentraler Erregungs- und Beruhigungsmittel ergibt.

2. Von dieser Wirkung des Aktedrons wurde eine Dosiswirkungskurve aufgenommen.

3. Es wurde nachgewiesen, dass die Hypnotika, den durch das Aktedron erzeugten Bewegungszwang in verschiedener Weise beeinflussen. Er wird durch Morphin-Skopolamin Kombination verhindert, durch Urethan wesentlich, durch Paraldehyd und NaBr kaum vermindert, durch Sevenal und Chloralhydrat nicht beeinflusst.

LITERATUR

1. *Slonaker, J. R.:* Anat. Rec. **2**, 116 (1908).
2. *Richter, C. P., Wang, G. H.:* J. Lab. Clin. Med. **12**, 289 (1926).
3. *Hemmingsen, A. M., Krarup, N. B.:* Biologiske Meddelser. **13**, 1 (1937).
4. *Park, O., Woods, L. O.:* Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **43**, 366 (1940).
5. *Szymanski, J. S.:* Pflügers Arch. **158**, 343 (1914).
6. *Herter, K.:* Z. vergl. Physiol. **20**, 511 (1934).
7. *Scott, C. C., Worth, H. M.:* Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **66**, 285 (1947).
8. *Schlaginweit, E.:* Schmiedebergs Arch. **131**, 212 (1928).
9. *Forst, A. W.:* ibidem **189**, 288 (1938).
10. *Aschoff, J.:* Pflügers Arch. **254**, 262 (1951).
11. *Alles, G. A.:* J. Pharm. Exper. Ther. **47**, 339 (1933).
12. *Hjort, A. M., Beer de E. M., Fasett, D. W.:* ibidem **63**, 421 (1938).
13. *Chakravarti, M.:* ibidem **67**, 153 (1939).
14. *Detrick, L. E., Millikan, R., Modern, F. S., Thienes, C. H.:* ibid. **60**, 56 (1937).
15. *Handley, Abreu:* Anesth. et Analg. **20**, 212 (1941).
16. *Werner, H. M.:* J. of Pharm. a. Exper. Ther. **66**, 39 (1939).
17. *Reifenstein, E. C. jr.:* ibid. **69**, 298 (1940).
18. *Boyd, E. M.:* Brit. Med. J. **1**, 729 (1940).
19. *Alles, G. A.:* Univ. Calif. Pub. in Pharmacol **1**, 129 (1939). cit. Emerson G. A. J. of Pharm. a. Exper. Ther. **76**, 11 (1942).

20. *Trevan, J. W.:* Proc. Roy. Soc. Med. **32**, 391 (1939).
21. *Spiegel, E.:* J. Pharm. Exp. Ther. **63**, 438 (1938).
22. *Herken, H., Kewitz, H., Klempau, J.:* Schmiedebergs Arch. **215**, 217 (1952).

НОВЫЙ СПОСОБ ИЗМЕРЕНИЯ ЛОКОМОТОРНОЙ РЕАКЦИИ ПОДОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ (ИССЛЕДОВАНИЯ АКТЕДРОНОМ)

Э. Комлош, Я. Кнолл, Л. Тардош и В. Сас

Фармакологический институт медицинского университета, г. Будапешт

Р е з ю м е

1. Простой, легко воспроизводимый метод для измерения локомоторной реакции небольших животных, дающий количественные результаты. На дно колеблющейся клетки авторы закрепили перевернутый книзу стеклянный колокол, снабженный отводящей трубой, конец которой погружен в наполненный водой сосуд. Смещением клетки кинзу из колокола вытесняется воздух отводимый в банку Девиля, закрытую наверху, и снизу снабженную выводящей трубой. При этом воздух вытесняет из банки соответствующее своему объему количество воды. Постоянное давление обеспечивается присоединенным к системе чувствительным водяным клапаном. Величину локомоторной реакции авторы измеряли $см^3$-ами вытесненной в течение единицы времени воды. (рис. 1).

2. Авторами составлена кривая для эффекта дозы фенамина данные которой приведены в статье.

3. Авторами установлено, что из числа гипнотиков, только комбинация морфина-скополамина может совершенно тормизить, а уретан сильно тормозить локомоторному действию фенамина, в то время как антинаркотическое действие фенамина, за исключением морфина-скополамина всегда проявляется. Из этого, авторами сделан вывод по различным точкам приложения локомоторного и антинаркотического действия фенамина.

Microbiologia

UNTERSUCHUNG MIT DEM VIRUS DER AUJESZKYSCHEN KRANKHEIT

Von

G. IVÁNOVICS, A. KOCH und E. CSEREY-PECHÁNY

MIKROBIOLOGISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, SZEGED

(Eingegangen: am 26. Nov. 1952)

Die derzeitigen Kenntnisse über das Virus der Aujeszkyschen Krankheit (im nachstehenden Ay-Virus) sind noch recht mangelhaft. So ist über die Beziehungen dieses Virus gegenüber den empfänglichen Zellen sozusagen überhaupt nichts bekannt, desgleichen sind auch über den Vermehrungsmechanismus dieses Virus kaum Angaben vorhanden. Die in unserem Institute jüngstens ausgearbeitete Wertbestimmungsmethode (1), die auf der zytopathogenen Eigenschaft dieses Krankheitserregers beruht, ermöglicht eine einfache und billige quantitative Bestimmung dieses Virus. Ausserdem kann das Virus in Gewebesuspensionen von zerstückelten Hühnerembryonen vorzüglich vermehrt werden, so dass man auf diese Weise ein stark infizierendes, verhältnismässig reines Virusmaterial erhält. Diese zwei methodischen Möglichkeiten gaben den Anstoss zu einer eingehenden Untersuchung des Ay-Virus. Die im nachstehenden beschriebenen Untersuchungen hatten zum Ziel, Aufschlüsse über die Affinität des Ay-Virus gegenüber empfänglichen Geweben und über die Vermehrungsweise dieses Virus zu gewinnen.

Material und Methoden

Virusmaterial. Das in den Versuchen verwendete Virus war ein ursprünglich aus Schweinen isolierter Stamm (Ay Nr. XXV). Dieser wurde durch dreitägige Überimpfungen in Gewebekulturen aus Hühnerembryonen gezüchtet. Die Züchtung erfolgte in Erlenmeyerkolben von 100 ml, in welche ungefähr 150 mg Gewebebrei gegeben wurde. Dieser Brei wurde aus ungefähr 10—13 Tage alten Hühnerembryonen hergestellt, deren Kopf und Gliedmassen entfernt worden waren, worauf der Rest mit der Schere fein zerstückelt und je Embryo mit 10—15 ml Simms-X_6-Lösung gewaschen wurde. Auf diese Weise erhält man aus ungefähr 150 mg Embryonengewebe 0,2 ml fein zerstückelten und gewaschenen Gewebebrei. Dieser wurde dann in 3,6 ml SU-Nährlösung (3 Teile Simms-X_6-Lösung und 1 Teil Rinderserum-Ultrafiltrat mit einem Penicillin- und Streptomycingehalt von je 5 Einheiten/ml) suspendiert und mit 0,4 ml des vorherigen Passagevirusmaterials beimpft. Das Gesamtvolumen einer solchen Kultur betrug rund 4 ml. Die Kultur wurde zuerst mit einem Gummistopfen abgeschlossen, doch wurde später die Erfahrung gemacht, dass auch ein gut schliessender Stopfen aus zusammengedrehten Zellulosestreifen dem Zweck entspricht. Eine Verdunstung der Kulturen wurde durch Sättigung des Luftraumes des Thermostaten mit Wasserdampf verhindert. Nach Ablauf der Züchtung wurde der Inhalt des Kölbchens im Mörser homogenisiert und dann 10 Minuten lang bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Das in den Versuchen verwendete Virusmaterial wurde in jedem einzelnen Falle titriert.

Titrierung des Virus. Die Titrierung des Virus erfolgte in der Regel mit Hilfe von Gewebekulturen auf Grund seiner Zytopathogenität. Über die näheren Einzelheiten des Verfahrens

gibt die obenerwähnte frühere Mitteilung (1) Auskunft. Hier sei dieses Verfahren lediglich in grossen Zügen gestreift, wobei nur die neuerdings eingeführten Modifikationen genauer beschrieben werden sollen.

In Jenaer Röhrchen von 110×18 mm ⌀ wird 1,8 ml SU-Nährlösung eingemessen und aus dem virushaltigen Material eine dem 10. Verdünnungsgrad entsprechende Serie hergestellt. Falls mit einem geringen Virusgehalt gerechnet wird, so wird in das erste Röhrchen unverdünntes Virusmaterial gegeben. Die Verdünnungen wurden nach der von *Takátsy* eingeführten Methode (2) mit einer rostfreien Metallöse von 0,2 ml Inhalt hergestellt. In jedes Röhrchen werden 6—7 Stückchen fein zerstückelter Herzmuskeln von 14 Tage alten Hühnerembryonen getan. Nach der Zugabe der nassen Herzstückchen beträgt der Inhalt des im Röhrchen befindlichen Materials ungefähr 2 ml. In den Versuchen wurden Embryonenherzen benutzt, die auch nach der Herausnahme aus dem Körper lebhaft pulsierten. Von den Herzen werden die grossen Gefässe und die Antren abgeschnitten, die Herzen dann in Petrischalen mit der Schere fein zerstückelt und mittels Sedimentation zweimal mit Simms-X_6-Lösung gewaschen. Zu jedem Versuch werden mehrere Herzen verwendet, die immer gleichzeitig aufgearbeitet werden.

Nach Zugabe der Herzstückchen werden die Röhrchen mit dem Stopfen verschlossen und 72 Stunden hindurch im Thermostaten bei 37° C gehalten. Danach werden aus jeder Röhre einzeln je vier Herzstückchen herausgenommen und auf eine entfettete, sterile Glasplatte von 25×42×1,5 mm gelegt; die zusammen mit den Herzstückchen dorthin gelangte Flüssigkeit wird mit einer feinen Kapillare abgesogen. Auf jedes einzelne Stückchen wird sodann Hühnerplasma gelegt, das je einen Tropfen Embryonalextrakt und Heparin enthält, und das Herzmuskelstück mittels eines erhitzten Platindrahtes in die Flüssigkeit eingebettet. Das in dem rasch gerinnenden Plasmatropfen eingeschlossene Explantat wird mit einem hohlgeschliffenen Objektträger abgedeckt. Die Explantate werden daraufhin für 72 Stunden in den Thermostaten gelegt, wobei ihr Zustand täglich registriert wird. Über die hierbei wahrgenommenen Veränderungen gibt die obenerwähnte Abhandlung (1) Auskunft. Als Titer der virushaltigen Flüssigkeit wird jene grösste Verdünnung betrachtet, auf deren Wirkung hin zumindest die Hälfte der explantierten Herzstückchen überhaupt nicht wächst oder im Falle von Wachstum die charakteristische Schädigung von Fibroblasten zeigt.

Ausdruck der Virusmenge. Im Zuge der verschiedenen Aufgaben erwies es sich als notwendig, den Virusgehalt einzelner Teile der Gewebekulturen, so z. B. der Gewebestückchen und der Nährlösung, gesondert ausdrücken zu können. Deshalb wurde im Laufe der vorliegenden Untersuchungen der Begriff der zytopathogenen Einheit des Virus angewandt. Wie bereits erwähnt, erfolgte die Titrierung der zytopathogenen Wirkung des Ay-Virus in Verdünnungsserien von je 2 ml Inhalt. Als zytopathogene Einheit (CE) des Virus wurde jene kleinste Menge betrachtet, die in 2 ml Flüssigkeit die bereits erwähnte Wirkung zustande brachte, d. h. zumindest die Hälfte der Herzstückchen der Hühnerembryonen schädigte. Die Berechnung der zytopathogenen Einheit (CE) geschah also im wesentlichen auf Grund des Titers der virushaltigen Flüssigkeit. In den Gewebekulturen diente 0,2 ml Gewebebrei in 4 ml Nährlösung zur Vermehrung des Virus, so dass eine andere Masseinheit eingeführt werden musste, wenn man den Virusgehalt der Nährlösung oder der Gewebestückchen ausdrücken wollte. Deshalb wurde bei der Bestimmung des Virusgehaltes der von den Gewebestückchen abgesonderten Nährlösung in das erste Röhrchen 2 ml dieser Flüssigkeit getan, während die übrigen Röhrchen dasselbe Volumen der Verdünnungen dieser Flüssigkeit enthielten. Wenn sich nur in der ersten, also unverdünnten Flüssigkeit die Wirkung zeigte, dann befand sich 1 CE in 2 ml, demnach enthielt die Flüssigkeit der ganzen Kultur 2 CE. Wenn der Titer beispielsweise 1 : 1000 war, dann enthielt die ganze Nährlösung 2000 CE. Derselbe Grundsatz wurde auch zum Ausdruck des Virusgehaltes herangezogen, wenn die ganze Kultur, also die Gewebestückchen in ihrer eigenen Flüssigkeit, homogenisiert wurden.

Anders musste vorgegangen werden, wenn der Virusgehalt der Gewebestückchen ausgedrückt werden sollte. In diesem Falle wurde die Kultur abzentrifugiert, der Satz zweimal mit Simms-X_6-Lösung gewaschen, dann der Satz, der einem Gewebebrei von 0,2 ml entsprach, mit 1,8 ml SU-Nährlösung im Mörser homogenisiert und der zentrifugierte Extrakt zur Bestimmung des Virus benützt. Da in den Versuchen immer mehrere, in der Regel 3 gleiche Kulturen verwendet wurden, wurde die erwähnte Operation mit dem vereinten Material durchgeführt, so dass eine genügende Flüssigkeitsmenge gewährleistet war. Wenn im Laufe der Titrierung nur dieser Gewebeextrakt von 1 : 10 sich als wirksam erwies, so enthielt der Gewebebrei der einzelnen Kulturen 10 CE. Es mussten also zumindest 10 CE im Gewebe enthalten sein, um dies nachweisen zu können. Die auf das Gewebe bezogene grösste Verdünnung gab demnach auch die Menge der im festen Teil der Gewebekultur enthaltenen Viren in zytopathogenen Einheiten an.

In der vorhergehenden Abhandlung wurde der Titer des Infektionsmaterials nach der Formel von *Reed* und *Muench* (3) berechnet. Da unter den vorliegenden Versuchsbedingungen

liese Formel keine Vorteile aufwies, wurde die bereits beschriebene Modifikation angewandt. Dies hatte zur Folge, dass die Fehlergrenze des hier angewandten Verfahrens zweifellos etwas grösser wurde. Aus diesem Grunde wurde die Differenz eines einzigen Exponenten noch nicht als charakteristisch angesehen und erst dann in Betracht gezogen, wenn sie in mehreren ähnlichen Versuchen konsequent in Erscheinung trat.

Verfahren zur Messung der Vermehrung des Virus. Die Gewebekultur wurde auf die bereits erwähnte Weise gezüchtet. Es wurde eine grosse Zahl von Kulturen hergestellt, wobei zu verschiedenen Zeitpunkten je 3 Kulturen vereinigt und zur Virusbestimmung aufgearbeitet wurden.

Titrierung des Virus in Mäusen. Um einige Kontrollversuche zu erhalten, wurde die Infektivität der virushaltigen Materialien auch durch Beimpfung von Mäusen bestimmt. In diesen Fällen wird der Titer in Verdünnungen angegeben, die sich auf das virushaltige Material beziehen. Zur intrazerebralen Beimpfung wurden stets 0,03 ml jeder Verdünnung benutzt.

Verwendete Immunseren. Es wurden zum Teil die Seren von Schweinen, welche die Aujeszkysche Krankheit überstanden hatten, und zum Teil die von immunisierten Ratten [*Koch* und *Ábrahám* (4)] verwendet. Der Neutralisationsindex beider Seren betrug mehrere Tausende.

EXPERIMENTELLER TEIL

Untersuchung der Ay-Virusadsorption der Gewebesuspensionen

In dieser Versuchsreihe wurden die Ay-Viren unter verschiedenen Umständen mit Gewebesuspensionen bzw. Homogenisaten in Kontakt gehalten, worauf nach Abzentrifugieren der Mischung der Virusgehalt der überstehenden Flüssigkeit bestimmt wurde. Von den in dieser Richtung vorgenommenen Versuchen soll nun zuerst eine mit Mäusegehirnhomogenisat durchgeführte Untersuchung beschrieben werden. In diesem Versuche wurde als Virusmaterial der Gehirnextrakt eines intrazerebral infizierten Kaninchens verwendet.

Das Gehirn des mit Ay-Virus infizierten Kaninchens wurde mit 10% inaktiviertes Kaninchenserum enthaltender physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 10 verrieben. Darauf wurde das Homogenisat abzentrifugiert. Aus dem Gehirnextrakt wurden dann weitere Verdünnungen hergestellt. Diese entsprachen — auf das ursprüngliche Material bezogen — Verdünnungen von 1 : 50, 1 : 500 und 1 : 5000. Zu je 1 ml Verdünnung wurde 1 ml 10%ige Suspension eines im Mörser mit physiol. Kochsalzlösung homogenisierten Mäusegehirns gegeben ; die Verdünnungen wurden daraufhin 30 Minuten lang bei 37° C stehen gelassen und danach gründlich abzentrifugiert. Der Virusgehalt der reinen Flüssigkeit wurde durch intrazerebrale Injektion an Mäusen bestimmt. In der Kontrollreihe wurde an Stelle von Gehirnsuspension serumhaltige Kochsalzlösung verwendet. Die Ergebnisse des Versuches sind aus Tabelle I ersichtlich.

Laut obigem Versuche besitzt also das homogenisierte Mäusegehirn keine wesentliche virusadsorbierende Eigenschaft.

Im nächsten Versuch wurde die virusadsorbierende Wirkung von fein zerstückeltem embryonalen Hühnergewebe untersucht. In diesem sowie in sämtlichen nachfolgenden Versuchen wurde bereits in Gewebekulturen gezüchtetes Virusmaterial verwendet.

TABELLE I

Infektiosität verschiedener Virusverdünnungen nach Behandlung mit 10%iger normaler Mäusegehirnsuspension

Verdünnung des Virus	Letalität der i. z. beimpften Mäuse	
	Mit Gehirn behandeltes Virusmaterial	Kontroile mit Kochsalz
10^{-2}	4/6	3/3
10^{-3}	2/6	3/6
10^{-4}		0/6

Der Zähler bedeutet die Zahl der eingegangenen, der Nenner die der beimpften Mäuse.

Zwölf Tage alte Hühnerembryonen, deren Kopf und Gliedmassen entfernt worden waren, wurden mit einer Schere fein zerstückelt. Die Hälfte der Gewebesuspension wurde 30 Min. lang auf 56° C erhitzt und die erhitzte sowie die ursprüngliche Suspension zweimal mit Simms-X_6-Lösung durch Zentrifugieren gewaschen. 0,2 ml des Satzes wurden im einen Erlenmeyerkolben von 100 ml pipettiert, dazu aus dem Virusmaterial der 26. Passagegewebekultur 2000 CE Virus hinzugefügt und das Volumen der Suspension mit SU-Nährlösung auf 4 ml ergänzt. Jedes Versuchsmaterial wurde in Triplikat hergestellt, danach wurden die zusammengehörigen Materialien vereint, die Gewebestückchen abzentrifugiert und der Virusgehalt der reinen Flüssigkeit mittels intrazerebraler Beimpfung von Mäusen titriert. Als Kontrolle diente Virusmaterial, das keine Gewebestückchen enthielt. Die diesbezüglichen Resultate sind in Tabelle II zusammengefasst.

TABELLE II

Titrierung von virushaltiger, mit überlebendem sowie mit erhitztem embryonalem Hühnergewebe behandelter Gewebekulturlösung in Mäusen

Verdünnung	Letalität der beimpften Mäuse		
	Kontrolle*	Mit überlendem Gewebe behandelt	Mit erhitztem Gewebe behandelt
10^{-2}	4/4	4/4	4/4
10^{-3}	4/4	4/4	4/4
10^{-4}	3/4	2/4	3/4
10^{-5}	0/4	0/4	0/4

* Virusmaterial ohne Gewebestückchen.

Aus diesem Versuche geht hervor, dass die Suspension von embryonalem Hühnergewebe über keine nachweisbare Fähigkeit verfügt, das Ay-Virus zu binden.

Ähnliche Versuche wie die soeben beschriebenen wurden bei mehreren Gelegenheiten ausgeführt. In diesem wurde aber nicht nur der Virusgehalt der Nährlösung, sondern auch der des abzentrifugierten Gewebes bestimmt. In diesem Falle wurden die Gewebesuspensionen von virushaltigen Hühnerembryonen abzentrifugiert, der Satz dreimal mit je 8 ml Simms-X_6-Lösung gewaschen und schliesslich im Verhältnis von 1 : 10 mit SU-Nährlösung im Mörser extrahiert. Der Virusgehalt des Extraktes und der Gewebekultur-Nährlösung wurde auf Grund ihrer zytopathogenen Wirkung bestimmt. Das Ergebnis von zwei solchen Versuchen ist in Tabelle III vorgeführt.

TABELLE III

Untersuchung der Virusadsorption von embryonalen Hühnergewebesuspensionen auf Grund der Bestimmung des Virusgehaltes der Nährlösung sowie der Gewebestückchen

Inkubationsdauer	Gefundene Virusmenge in CE									
	Versuch Nr. I.					Versuch Nr II				
	Überlebend		Erhitzt		Kontr.	Überlebend		Erhitzt		Kontr.
	N	S	N	S		N	S	N	S	
0	200	<10	200	<10	20	2000	<10	2000	<10	2000
1h	200	<10	200	<10	200	2000	<10	200	<10	2000
2h	200	10	200	<10	20	2000	10	2000	<10	2000
3h	200	10	200	10	200	200	10	2000	<10	2000
4h	200	100	200	100	200					

Erklärung: N=Virusgehalt der Nährlösung; S=Virusgehalt des Satzes; Kontrolle= Virusgehalt der Nährlösung ohne Gewebestückchen; Erhitzt=auf 56° C erhitztes embryonales Hühnergewebe. < 10 bedeutet, dass das gewaschene und in einem Verhältnis von 1 : 10 extrahierte Gewebe nicht infektiös war.

Wenn man von der möglichen Versuchsfehlergrenze absieht, d. h. von Unterschieden von einem Exponenten, so kann festgestellt werden, dass während der Dauer des Versuches keine nachweisbare Menge von den der Nährlösung zugegebenen Viren verschwunden ist. Gegen das Ende des Versuches adsorbierte das mit den Viren in Kontakt stehende — sowohl überlebende als auch durch Erhitzung getötete — embryonale Hühnergewebe die Viren in derartigem Ausmass, dass diese trotz den mehrfachen Waschungen in den Gewebeextrakten nachweisbar blieben.

Zur Ergänzung der vorherigen Versuche wurde nunmehr untersucht, in welchem Zeitpunkt die Inaktivierung des Virus in SU-Nährlösungen, die keine Gewebestückchen enthalten, bei 37° C eintritt. Dabei konnte festgestellt

werden, dass unter solchen Verhältnissen eine 2000 CE entsprechende Virusmenge nach 8 Stunden noch keine nachweisbaren Zeichen von Inaktivierung zeigt, und dass erst nach 10 Stunden eine wahrnehmbare Titersenkung zu beobachten ist. Daraufhin wird die Inaktivierung immer rascher, und in der 16. Stunde hat das zugegebene Virusmaterial bereits vollständig seine Infektiosität verloren. Ähnliche Versuche wie die in Tabelle III zusammengefassten wurden auch wiederholt mit einer grösseren Menge [1 g] Gewebebrei von Hühnerembryonen ausgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche stimmten mit jenen der vorhergehenden Experimente überein, weshalb hier nicht näher auf sie eingegangen werden soll.

Demnach wird also eine kleine Virusmenge sowohl vom überlebenden wie auch von dem durch Hitze inaktivierten Gewebebrei, der mit ihm in Kontakt steht, mit der Zeit adsorbiert. Das Ausmass der Adsorption ist aber so geringfügig, dass sie auf Grund der Untersuchung des Virusgehaltes der Flüssigkeit — bei Berücksichtigung der grösseren Fehlergrenze der angewandten Methode — nicht nachgewiesen werden kann. Der folgende Versuch bezeugt jedoch, dass das Gewebe von überlebenden, zerstückelten Hühnerembryonen sehr bald eine kleine Menge von Viren bindet.

Einer Kultur, die 200 mg zerstückeltes und gewaschenes Gewebe von gemischten Hühnerembryonen enthielt, wurden 200 CE Virus beigemengt. Vor Zugabe des Virus wurde die Gewebekultur auf 37° C erhitzt. Sofort nach Zugabe des Virus wurde der Inhalt der Gewebekultur abzentrifugiert, danach die überstehende Flüssigkeit verworfen und der Satz mit 8 ml Simms-X_6-Lösung mittels Zentrifugierung gewaschen. Diese Operation wurde derartig rasch durchgeführt, dass die Gewebestückchen insgesamt bloss 3 Minuten mit dem zugefügten Virusmaterial in Kontakt standen. Die Waschung wurde dann auf ähnliche Weise noch zweimal wiederholt. Nach der letzten Waschung wurden die Gewebestückchen in 4 ml Nährlösung suspendiert und die Gewebekultur in einem Erlenmeyerkolben 24 Stunden lang in einen Thermostaten gestellt. Dieser Versuch wurde im Triplikat ausgeführt. Weitere je 3 Kulturen wurden mit dem beigefügten Virusmaterial 1, 2 bzw. 3 Stunden in Kontakt belassen, danach gewaschen und daraus Gewebekulturen hergestellt. Die auf die gleiche Weise hergestellten Kulturen wurden nach 24 Stunden vereint, im Mörser homogenisiert und ihr Virusgehalt auf Grund ihrer zytopathogenen Wirkung bestimmt (siehe Tabelle IV).

Demgemäss ist also auch ein nur wenige Minuten dauernder Kontakt mit einer geringfügigen Virusmenge zur Infektion der Gewebestückchen genügend. Als Wirkung eines längeren Kontaktes mit dem Virusmaterial entsteht nach 24 Stunden zweifellos eine weit grössere Virusmenge als nach einem nur kurzen Kontakt.

In dem obenbeschriebenen Versuch nimmt die wiederholte Waschung insgesamt ungefähr 10 Minuten in Anspruch, was zur Annahme berechtigt,

TABELLE IV

Virusgehalt von Kulturen aus verschieden lang mit 200 CE Virus in Kontakt gehaltenen und dann gewaschenen Gewebestückchen nach 24h

Dauer der Viruseinwirkung	Gefundene Virusmenge CE/4 ml
ca. 3 Min.	2.10^3
1h	2.10^6
2h	2.10^7
3h	2.10^7
24h (Kontr.)	2.10^7

dass die Entfernung des Virus stufenweise vor sich ging und dass daher auch jene Kulturen, die der Wirkung des Virus nur die allerkürzeste Zeit ausgesetzt waren, in Wirklichkeit längere Zeit mit dem Infektionsmaterial in Berührung standen, als es die in der Tabelle angegebene Zeit anzeigt. Andererseits muss aber auch damit gerechnet werden, dass durch den Waschprozess nicht alle Viruspartikeln, besonders nicht die in die Gewebespalten eingedrungenen, vollkommen entfernt werden können. Aus diesem Grunde erschien die Durchführung des folgenden Versuches angebracht.

In 4 ml Nährlösung wurde 150 mg embryonales Hühnergewebe suspendiert und mit 2000 CE Virus überimpft. Darauf wurde die Suspension eine Stunde bei 37° C stehen gelassen und sodann zentrifugiert. Der Satz wurde mit 4 ml SU-Nährlösung aufgeschwemmt, die 10% Rattenimmunserum enthielt. Auf ähnliche Weise wurden mit normalem Rattenserum Kontrollkulturen hergestellt. Nach verschieden langer Züchtungsdauer wurden die identischen Kulturen vereinigt, abzentrifugiert und die Gewebestückchen dreimal nacheinander in je 12 ml Simms-X_6-Lösung gewaschen, wonach schliesslich aus ihnen ein Extrakt im Verhältnis von 1 : 10 im Mörser hergestellt wurde. Die zytopathogene Wirkung der Nährlösungen wie auch die der Gewebeextrakte wurde gesondert titriert. Die Ergebnisse werden in Tabelle V gezeigt.

TABELLE V

Virusgehalt von Hühnerembryonen-Gewebekulturen bei Züchtung in infizierter und dann immunserumhaltiger Nährlösung

Serum	Untersuchter Kulturteil	Virusgehalt in CE nach verschieden langer Züchtung		
		18 h	24 h	36 h
Normale Ratten ...	Flüssigkeit	20	200	20
	Gewebe	100	1000	100 000
Immune Ratten ...	Flüssigkeit	<2	<2	<2
	Gewebe	10	10	10

Wie ersichtlich setzt die Vermehrung der Viren selbst dann ein, wenn nach der Infektion der Gewebestückchen die Züchtung in Immunserum enthaltender Nährlösung vorgenommen wurde. In Gegenwart von Immunserum kam es aber auf den Gewebestückchen nur zur Entstehung einer geringen Menge von Virus und die Nährlösung wies überhaupt keine Infektiosität auf.

In einem anderen Versuch wurden mit Virusmaterial behandelte Herzstückchen von Hühnerembryonen in Immunserum gelegt und danach in der gewohnten Weise explantiert. Die Ausführung dieses Versuches geschah folgendermassen.

In einer Serie von Röhrchen wurden in 2 ml Nährlösung verschiedene Verdünnungen des Ay-Virus hergestellt und dann in jedes Röhrchen 8—10 Stückchen zerkleinerter Embryoherzen getan. Die Röhrchen wurden 3 Stunden auf 37° C gehalten, worauf die Nährlösung abgesaugt und statt ihr 10%iges immunes bzw. von normalen Schweinen stammendes Blutserum beigemischt wurde. Die Verdünnungen des Blutserums wurden mit SU-Nährlösung hergestellt. Die Röhrchen gelangten nun für 24 Stunden in einen auf 37° C eingestellten Thermostaten. Daraufhin wurde jedes Herzstückchen gesondert in ein Gemisch von Hühnerembryonenextrakt und Plasma eingebettet und auf diese Weise zu einer Hängetropfenkultur verarbeitet. Aus jeder Verdünnung wurden drei Kulturen gewonnen. Das Wachstum der Explantate wurde nach 72 Stunden gemessen (vgl. Tabelle VI).

TABELLE VI

Wachstum von Hühnerembryonen-Herzstückchen nach ihrer Explantation nach Kontakt mit verschieden verdünntem Virusmaterial und nach darauffolgender Behandlung mit Immunserum

Serum	Virusverdünnung*				
	1:5	1:25	1:125	1:626	1:3215
Immune Schweine	3/3**	2/3	0/3	0/3	0/3
Normale Schweine	3/3	3/3	3/3	2/3	1/3

* Verdünnung der homogenisierten Gewebekultur.

** Der Zähler bedeutet die Zahl der die Symptome einer Virusinfektion zeigenden, der Nenner die von sämtlichen Explantaten.

Bei den normalen und mit Immunserum behandelten, zuerst mit Virus infizierten Herzstückchen kam die zytopathogene Wirkung in sehr verschiedenem Ausmass zur Geltung. Infolge der nachträglichen Behandlung mit Immunserum gingen die Herzstückchen von Hühnerembryonen nur im Falle des Vorhandenseins einer grossen Zahl von Viren zugrunde. Demgegenüber war im Falle von Anwendung normalen Serums die zytopathogene Wirkung selbst bei Kontakt mit einem bedeutend verdünnten Virusmaterial offenkundig.

Untersuchung der Adsorptionsfähigkeit von gewaschenen roten Blutkörperchen gegenüber dem Ay-Virus

Mit hochinfektiösem Virusmaterial aus Hühnerembryonen-Gewebekulturen wurde der Versuch gemacht, die roten Blutkörperchen verschiedener Tierarten zu agglutinieren. Es wurde hierbei von einem Virusmaterial ausgegangen, das bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} infektiös war, und aus diesem Material Verdünnungsserien hergestellt, die mit einem gleichen Volumen einer 0,5%igen Suspension von gewaschenen roten Blutkörperchen von verschiedenen Tierarten versetzt wurden. Das erste Glied der Reihe bestand aus unverdünntem Virusmaterial. Als Verdünnungsflüssigkeit wurde eine 0,9%-ig gepufferte Kochsalzlösung benutzt. Im Falle von roten Blutkörperchen von Ratten wurden die Verdünnungen mit isotonischer Magnesiumsulfatlösung hergestellt, da auf diese Weise die spontane Agglutination der Blutkörperchen des Tieres vermieden werden kann [*Chu* (5)]. Diese Versuche wurden wiederholt mit den Erythrozyten von Kaninchen, Hühnern, Mäusen, Ratten und Meerschweinchen sowohl im Eisschrank als auch bei Zimmertemperatur durchgeführt, wobei in keinem einzigen Falle eine Agglutination wahrgenommen werden konnte.

Im weiteren wurde die Virusadsorptionsfähigkeit der roten Blutkörperchen einiger Tierarten untersucht. Hierbei wurde zu 1 ml 5%iger Erythrozytensuspension 1 ml entsprechend verdünnte Viruskultur gegeben, wonach die Röhrchen 30 Minuten hindurch auf 4° C gehalten wurden. Nach Zentrifugieren wurde der Virusgehalt der reinen Flüssigkeit bestimmt. Diese Versuche wurden mit roten Blutkörperchen von Meerschweinchen, Kaninchen und Hühnern ausgeführt. In jedem einzelnen Falle wurden in der mit den Blutkörperchen behandelten Flüssigkeit 100 CE gefunden, und ebenso viele Viren wurden auch im Kontrollversuch nachgewiesen. Die Adsorption des Virus an die roten Blutkörperchen konnte also auch auf diese Weise nicht bestätigt werden.

Der Verlauf der Vermehrung des Ay-Virus in zerstückeltem embryonalem Hühnergewebe

In der vorhergehenden Mitteilung (1) wurde nachgewiesen, dass die Virusvermehrung in Kulturen aus embryonalem Hühnergewebe schon in der 24. Stunde festgestellt werden kann. Die Infektiosität der Kulturen wächst danach weiter an und der Virusgehalt bleibt in der Regel bis zur 120. Stunde beträchtlich. Es wurde seinerzeit auch festgestellt, dass der Virusgehalt der Gewebestückchen ungefähr 100—1000mal so gross ist wie jener der Nährlösung. Die zur Erforschung von weiteren Einzelheiten dieser Frage angestellten Versuche sollen nun im nachstehenden beschrieben werden.

Im Zuge von Vorversuchen fiel es auf, dass die Virusvermehrung in Kulturen, die mit einer Virusmenge von 20—2000 CE überimpft waren, bis zur 14.

und selbst bis zur 16. Stunde nicht einsetzt, und dass bis zu diesem Zeitpunkt der Virusgehalt der Kultur meistens sogar wesentlich abnimmt. Falls eine auf 56° C erhitzte Gewebesuspension verwendet oder das Virus zu einer Nährlösung zugefügt wurde, die kein Gewebe enthielt, war der Gehalt des Kölbchens in der 16.—24. Stunde schon überhaupt nicht mehr infektiös. Ein solcher Versuch wird in Tabelle VII vorgeführt.

TABELLE VII

Virusgehalt in CE von Kulturen aus zerstückelten überlebenden und auf 56° C erhitzten embryonalen Hühnergeweben nach verschieden langer Zeit

Züchtungsdauer	Überlebendes Gewebe		Erhitztes Gewebe		Ohne Gewebe
	Flüssigkeit	Satz	Flüssigkeit	Satz	
8h	20	100	20	<10	200
16h	20	100	<2	<10	2
24h	200	1 000 000	2	<10	<2

Laut den Angaben dieser Tabelle lässt sich also in der 24. Stunde in den Gewebestückchen der Kulturen eine sehr bedeutende Virusmenge nachweisen, die zur Gänze in der Zeitspanne zwischen der 16. und 24. Stunde entstanden ist. In der Nährlösung kann hingegen nur 1/5000 der Virusmenge festgestellt werden.

Der Virusgehalt der Nährlösung und des Gewebes wurde in einer Versuchsperiode von 96 Stunden aufmerksam verfolgt, wozu eine grosse Anzahl von Kulturen verwendet wurde, das mit einer 200 CE entsprechenden Menge des 50. Passagevirus infiziert war. Die Ergebnisse sind in Tabelle VIII veranschaulicht.

TABELLE VIII

Virusmenge in den Gewebestückchen und in der Nährlösung von Hühnerembryonen-Gewebekulturen nach Beimpfung mit 200 CE

Zeit	Nährlösung	Satz*
0′	200	<200
40′	20	<200
3h	2	200
10h	< 20	200
23h	<200	<200 000
36h	2000	2 000 000
48h	2000	200 000
72h	200	200 000
96h	2000	20 000

* Im gegenwärtigen Fall war das Verhältnis des Grundextraktes des Satzes 1 : 20.

Auch aus diesem Versuch ist es ersichtlich, dass das Virus sich bis zur 10. Stunde nicht vermehrt hat. Zwischen der 23. und 36. Stunde erreicht die Virusmenge ihr Maximum, doch ist später bereits eine Abnahme der Infektiosität der Kulturen zu beobachten. Am Ende des Versuches ist schon ein bedeutenderer Bruchteil des gesamten Virusmaterials in der Nährlösung anzutreffen und gleichzeitig ist auch die Abnahme der gesamten Virusmenge bereits auffallend.

Nach diesen Versuchen beginnt die Vermehrung des Virus in Gewebekulturen erst nach einer beträchtlichen Inkubationszeit. Zur genaueren Bestimmung dieser Inkubationszeit wurde eine grosse Zahl von Kulturen, die mit einer Virusmenge von 200 CE infiziert waren, von der 8. Stunde an in Intervallen von 2 Stunden zur Feststellung ihres Virusgehaltes aufgearbeitet. Zu jedem einzelnen Zeitpunkt wurden je 3 Kulturen abzentrifugiert, der Satz gewaschen, dann mit SU-Nährlösung extrahiert, und die zytopathogene Wirkung der aus dem Gewebe gewonnenen Flüssigkeit gemessen. Die so gefundenen Werte sind in Tabelle IX angegeben.

TABELLE IX

Vermehrung des Virus in Hühnerembryonen-Gewebekulturen nach Beimpfung mit 200 CE

Züchtungsdauer	Im Gewebe gefundene Virusmenge in CE
8h	100
10h	100
12h	<10
14h	<10
16h	1000
18h	10 000
20h	10 000
22h	100 000
24h	10 000 000

Wie ersichtlich, sind selbst in der 14. Stunde erst Spuren des Virus in der Kultur zu finden. Nach diesem Zeitpunkt erfolgt die Vermehrung des Virus in stürmischer, ja manchmal direkt sprunghafter Weise; besonders gewaltig war die Zunahme der Virusmenge zwischen der 22. und der 24. Stunde.

Wegen der langen Inkubationszeit war es auch nicht ausgeschlossen, dass das zerstückelte und mit entsprechender Waschung vorbereitete embryonale Hühnergewebe eine gewisse Zeit benötigt, bis es die zur Vermehrung des Virus erforderlichen Bedingungen gewährleisten kann. Zur Klarstellung dieser Frage wurde folgender Versuch ausgeführt.

Aus dem Gewebe von verschiedenen Hühnerembryonen wurden Kulturen angelegt und vor Zugabe des Virus 11 Stunden hindurch bei 37°C im Thermostaten gehalten. Dann wurde wieder eine grössere Anzahl von Gewebekulturen hergestellt und diese gleichzeitig mit den bereits vorinkubierten Kulturen mit einer Virusmenge von 2000 CE beimpft. Der Verlauf der Virusvermehrung in den auf zweierlei Weise beimpften Gewebekulturen geht aus Tabelle X hervor.

TABELLE X

Virusgehalt von Kulturen aus zerstückelten Hühnerembryonen zu verschiedenen Zeitpunkten nach sofortiger und nach 11stündiger vorheriger Züchtung erfolgter Infektion

Züchtungsdauer	Virusmenge in CE	
	Sofort infizierte Kultur	Nach Vorinkubation infizierte Kultur
11h	10	10
14h	10^2	10^3
24h	10^7	10^6

Aus den Angaben der Tabelle lässt es sich feststellen, dass der Unterschied zwischen dem auf zweierlei Art durchgeführten Versuch innerhalb der Fehlergrenze der Wertbestimmungen liegt. In beiden Fällen setzte die Vermehrung des Virus erst in der 14. Stunde ein. Aus diesem Versuch geht klar hervor, dass die Inkubationszeit der Vermehrung des Ay-Virus nicht mit dem Zustand des Gewebes in Zusammenhang steht, sondern als eine charakteristische Eigenschaft des Virus anzusehen ist.

Diskussion

Einige Viren, wie der Influenzavirus, Newcastlevirus und Mumpsvirus, weiters der Mäusepneumonitisvirus werden von den die entsprechenden Virusrezeptoren enthaltenden Gewebeelementen oder roten Blutkörperchen sehr schnell und in grossem Ausmass adsorbiert. Suspensionen von Mäuse- und Hamsterlungen adsorbieren auch von überflüssigen Mengen des Mäusepneumonitisvirus mehr als 90%. Im Falle eines günstigeren Verhältnisses wird dann die gesamte Virusmenge innerhalb einer halben Stunde an die Zellen adsorbiert [*Curnen* und *Horsfall* (6)]. Auch dünne Suspensionen der roten Blutkörperchen gewisser Tierarten binden 97—100% des Influenza A-, B- und des Newcastlevirus [*Horváth* und Mitarbeiter (7)]. Die virusadsorbierende Fähigkeit des Epithels von exzidierten Mäuse-, Hamster- und Meerschweinchenlungen ist ebenfalls überaus gross [*Hirst* (8), *Fazekas* (9), *Szőllősy* und Mitarbeiter (10)].

Ein Gehirnhomogenisat von Mäusen, die dem Ay-Virus gegenüber sehr empfänglich waren, adsorbiert das Virus nicht in einem nachweisbaren Ausmass. Auch von Suspensionen roter Blutkörperchen verschiedener Tierarten wird das Virus nicht gebunden. Im wesentlichen kommt auch dem Umstand, dass das Ay-Virus nicht die roten Blutkörperchen agglutiniert, dieselbe Bedeutung zu.

Diese Feststellungen wurden auf Grund der Bestimmung der Infektiosität einer Flüssigkeit gemacht, die aus dem Gewebehomogenisat des virushaltigen Materials bzw. nach dessen Vermischung mit roten Blutkörperchen und nach dessen Zentrifugierung gewonnen wurde. Die Wertbestimmungen erfolgten teils durch intrazerebrale Beimpfung von Mäusen und teils auf Grund der Zytopathogenität des virushaltigen Materials. Von diesen Methoden zeigt die letztere wegen ihrer grossen Fehlergrenze die Adsorption der Viren nur in jenem Falle an, wenn deren Ausmass 90% übersteigt. Die mit Mäusen durchgeführten Titrierungen sollten hingegen auch die schon angezeigte Differenz von einem einzigen Exponenten aufdecken. Eine derartig grosse Adsorption des Ay-Virus findet also unter den angewandten Versuchsverhältnissen nicht statt.

Aus den mit Gewebesuspensionen von überlebenden Hühnerembryonen ausgeführten Versuchen ging hervor, dass das Gewebe im Falle von längerer Berührung einen Teil des Ay-Virus adsorbiert. Dieser Bruchteil ist aber klein und erreicht keinesfalls 90%. Die Virusadsorption liess sich mit Bestimmtheit nur auf Grund der Untersuchung des Extraktes der mit dem Virus in Kontakt gestandenen Gewebestückchen feststellen. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass in einer Gewebekultur aus zerstückelten Hühnerembryonen ein kleiner Bruchteil des zugegebenen Virus allmählich, innerhalb einiger Stunden adsorbiert wird. Dies ist zugleich auch mit der Infektion der Gewebe gleichbedeutend. Dieser Vorgang spielt sich anscheinend nur allmählich und nicht innerhalb weniger Minuten, sondern eher innerhalb einiger Stunden ab. Dabei haftet ein Teil des zu der Gewebesuspension von zerstückelten Hühnerembryonen gegebenen Virusmaterials in einer durch Waschen nicht leicht zu entfernenden Weise an den Gewebestückchen an. Es darf angenommen werden, dass dieser Teil noch vom Antikörper gebunden zu werden vermag und dass dies der Grund dafür ist, dass in der vorher infizierten und dann in Gegenwart von Immunserum gezüchteten Gewebekulturen nur eine geringfügige Menge des Virus gefunden werden kann. Es ist seit langem bekannt, dass in den infizierten und nachträglich in Gegenwart von Immunserum gezüchteten Geweben das Virus sich vermehren kann, doch gewähren die früheren Versuche keinen Einblick in die quantitativen Verhältnisse dieser Vermehrung. In ihren Versuchen haben *Andrewes* (11) mit dem Virus III und *Sabin* (12) mit dem Ay-Virus Kaninchenhodenstücke infiziert und dann diese in eine Antikörper enthaltende Tyrodelösung gelegt. Sie stellten dabei fest, dass die Vermehrung des Virus

auch in Anwesenheit des Antikörpers erfolgte. Diese Versuche enthielten aber keinerlei Hinweise auf die Grösse der entstandenen Virusmenge.

Nach der Meinung der Verfasser der vorliegenden Abhandlung kann der Grund für die geringfügige Vermehrung des Virus im Gewebe von infizierten und dann in Gegenwart von Immunserum gezüchteten embryonalen Hühnerstückchen darauf zurückgeführt werden, dass die Infektion der embryonalen Hühnerzellen nur allmählich eintritt. In einem Immunserum enthaltenden Medium wird der Übergang der Infektion von den bereits infizierten Zellen der Gewebestückchen auf neue Zellen durch die Anwesenheit der Antikörper vielleicht schon behindert. Für eine allmähliche Infektion der Gewebeelemente spricht auch der Umstand, dass die Virusvermehrung in einem 1 Stunde lang mit der Virussuspension in Kontakt gestandenen embryonalen Hühnergewebe auch dann stark ausgeprägt war, wenn dieses vor der Züchtung sorgfältig gewaschen wurde ; dagegen entstand nur wenig Virus, wenn die Infektion nur einige Minuten gedauert hatte.

Im Laufe der hier beschriebenen Untersuchungen über den Gang der Vermehrung des Ay-Virus konnte die Feststellung gemacht werden, dass die Vermehrung dieses Virus in Gewebekulturen erst nach einer sehr langen, 14—16 Stunden dauernden Inkubationszeit einsetzt. Danach wird die Virusvermehrung überaus rasch. Im Gegensatz zur kurzen, 6—9stündigen Latenzperiode des Influenzavirus (13) sind Viren bekannt, die sich erst nach einer weit längeren Latenzzeit, die ungefähr mit der Inkubationszeit des Ay-Virus übereinstimmt, zu vermehren beginnen. Das Ectromelia- und das Vakzinevirus vermehren sich erst nach 42 Stunden (14), das Lymphogranuloma Venereum-Virus nach 12 Stunden, das Felin pneumonitis- und das Meningopneumonitisvirus nach einer Latenz von 12—14 Stunden (15). Die Hauptmasse des sich in zerstückelten Hühnerembryonenstückchen vermehrenden Ay-Virus bleibt im ersten Zeitabschnitt (23—36 Stunden) in den Zellen eingeschlossen, wobei höchstens 0,1% in die Nährlösung gelangt. Im weiteren nimmt zugleich mit der Verminderung des Virusgehaltes der Gewebestückchen die Virusmenge in der Nährlösung derart zu, dass schliesslich 1—10% der gesamten Virusmenge dort anzutreffen ist.

Die bezüglich der Vermehrung des Ay-Virus bzw. der Adsorption dieses Virus an die Zellen gemachten Erfahrungen können folgenderweise zusammengefasst werden : Das embryonale Hühnergewebe sowie die roten Blutkörperchen verschiedener Tierarten besitzen keine Rezeptorenstoffe für das Ay-Virus, mit dessen Hilfe das Ay-Virus ähnlich wie das Influenzavirus sich an die Zellen adsorbieren könnte. Es scheint, dass hier die Infektion allmählich, infolge des Eindringens des Virus in die Zellen erfolgt. Über den näheren Mechanismus der Infektion, namentlich über die Art, in der das Eindringen des Virus vor sich geht, ist überhaupt nichts bekannt. Hier dürfte die Auffassung von *Fazekas* (16) über die Infektion des Influenzavirus als Analogie herangezogen

werden können, dass nämlich die Infektion durch die Tätigkeit der betroffenen Zellen (»Viropexis«) zustandekommt. Das in die Zelle eingedrungene Virus beginnt sich erst nach einer Inkubationszeit von 14—16 Stunden zu vermehren. In den folgenden Stunden wächst seine Menge rapid an. Das in den Geweben entstandene Virus bleibt eine Weile in den Zellen eingeschlossen und gelangt erst allmählich in die Nährlösung hinaus. Nach den von den Verfassern gemachten Beobachtungen (1, 17) gehen die mit dem Ay-Virus infizierten Zellen bald zugrunde und vom 2. Tage an steigert sich ihr Zerfall immer mehr. In diesem Zeitabschnitt tritt das extrazelluläre Virus in grösserer Menge in Erscheinung. Als Grund für die Verringerung des Virusgehaltes der ganzen Gewebekultur kann man die sukzessive Inaktivierung der in der Nährlösung befindlichen Viruspartikeln annehmen. Auf Grund der ausgeführten Versuche inaktiviert sich das extrazelluläre Virus bei Thermostattemperatur nach 10—12 Stunden äusserst rasch. Die Resultante dieser beiden Vorgänge ruft dann die allmähliche Senkung des Virusgehaltes der älteren Kulturen hervor.

Zusammenfassung

1. Auf Grundlage der Zytopathogenität des Virus der Aujeszkyschen Krankheit (Ay-Virus) können mit Hilfe von Hühnerembryonenherz-Explantaten die Verhältnisse der Adsorption dieses Virus und seiner Vermehrung in Gewebekulturen in befriedigender Weise untersucht werden.

2. Homogenisat aus Mäusegehirnen bringt keine nachweisbare Adsorption des Ay-Virus zustande.

3. Überlebendes, zerstückeltes embryonales Hühnergewebe adsorbiert das Ay-Virus nur in sehr geringem Ausmass.

4. In Gewebekulturen gewonnenes zelloses Virusmaterial inaktiviert sich bei 37° C nach 10 Stunden sehr schnell.

5. Auf die Menge des in embryonalem Hühnergewebe sich vermehrenden Virus übt die Dauer des Kontaktes einen massgebenden Einfluss aus. In Geweben, die nur wenige Minuten mit dem Virusmaterial in Kontakt standen, entsteht im Laufe ihrer Züchtung eine weit kleinere Virusmenge als in embryonalen Hühnergeweben, die der Wirkung des Virus stundenlang ausgesetzt waren.

6. Die Virusvermehrung in einem embryonalen Hühnergewebe, das mit dem Ay-Virus eine Stunde lang in Kontakt gestanden war, kann auch in einer 10% Immunserum enthaltenden Nährlösung festgestellt werden. Die entstandene Virusmenge ist aber überaus klein.

7. Das Ay-Virus agglutiniert nicht die roten Blutkörperchen verschiedener Tierarten, das Virus wird an den Blutkörperchen nicht adsorbiert. Sogenannte Rezeptorstoffe gegenüber diesem Virus konnten in den untersuchten Geweben und Blutkörperchen nicht nachgewiesen werden.

8. Das Ay-Virus beginnt sich in embryonalen Hühnergeweben erst nach einer Inkubationszeit von 14—16 Stunden zu vermehren. Nach dieser Latenzperiode geht die Vermehrung äusserst rasch vor sich, so dass die entstandene Virusmenge schon in der 24.—36. Stunde der Züchtung ihr Maximum erreicht. Die Vermehrungsintensität ist im Zeitraum von der 20. bis zur 24. Stunde der Züchtung am grössten.

9. Das in den Gewebekulturen entstandene Virus befreit sich erst allmählich aus seinem intrazellulären Zustand. Dieser Prozess kommt wahrscheinlich infolge des Zerfalles der infizierten Zellen zustande.

LITERATUR

1. *Cserey-Pechány, E., Béládi, I.* und *Ivánovics, G.:* Acta Physiol. Hung. **2,** 229 (1951)
2. *Takátsy, G.:* Kísérletes Orvostudomány **2,** 393 (1950).
3. *Reed, J. J.* und *Muench, H.:* Am. J. Hyg. **27,** 493 (1938).
4. *Koch, A.* und *Ábrahám, E.:* Acta Veterinaria Hung. **2** 271 (1952).
5. *Chu, C. H.:* J. Hyg. **46,** 239 (1948).
6. *Curnen, E. C.* und *Horsfall, F. L.:* J. Exp. Med. **83,** 105 (1946).
7. *Horváth, I., Szőllősy, E.* und *Ivánovics, G.:* Acta Physiol. Hung. **2,** 77 (1951).
8. *Hirst, G. N.:* J. Exp. Med. **78,** 99 (1943).
9. *Fazekas de St. Groth, S.:* Austral. J. Exp. Biol. **26,** 29 (1948).
10. *Szőllősy, E., Ivánovics, G.* und *Horváth, I.:* Acta Physiol. Hung. **3,** 431 (1952).
11. *Andrewes, C. H.:* Brit. J. Exp. Path. **10,** 188, 283 (1928).
12. *Sabin, A. B.:* Brit. J. Exp. Path. **16,** 84 (1935).
13. *Henle, W., Henle, G.* und *Rosenberg, E. B.:* J. Exp. Med. **86,** 423 (1947).
14. *Himmelweit, F.:* Brit. J. Exp. Path. **19,** 108 (1938).
15. *Weiss, E.:* J. Inf. Dis. **84,** 125 (1949).
16. *Fazekas de St. Groth, S.:* Nature **162,** 294 (1948).
17. *Ivánovics, G., Koch, A.* und *Vadász, J.:* Unveröffentlichte Beobachtungen.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ВИРУСУ АУЕСКИ

Д. Иванович, А. Кох и Е. Череи-Пехань

Микробиологический институт медицинского университета, г. Сегед

Резюме

1. Используя цитопатогенное свойство вируса Ауески, при помощи тканевых культур из сердца куриного эмбриона, условия адсорбции вируса и его размножения на тканевых культурах изучаемы удовлетворительным образом.

2. Гомогенезат головного мозга мышей не связывает вирус Ауески в выявляемой степени.

3. Переживающая, измельченная ткань куриного эмбриона связывает вирус Ауески в весьма незначительной степени.

4. Полученное на тканевых культурах свободное от клеток вирусное вещество при температуре в 37° С по истечению 10 часов быстро инактивируется.

5. Длительность контакта повлияет на количество вируса, размножающегося на тканях куриных эмбрионов, держанных в контакте с вирусом в течение различного времени. На тканях держанных в контакте с вирусом в течение несколько минут, после их разведения получаются гораздо меньше вирусов, чем на тканях куриного эмбриона, подвергнутых контакту в течение часов.

6. На тканях куриного эмбриона, держанных в контакте с вирусом Ауески в течение часа наблюдается размножение вируса даже в жидкой среде с 10%-ым содержанием иммунной сыворотки. Количество полученного вируса, однако, весьма незначительное.

7. Вирус Ауески не агглютинирует эритроциты различных животных пород; кровяными тельцами вирус не адсорбируется. В исследованных тканях и кровяных тельцах не удалось выявить т. н. рецепторное вещество против этого вируса.

8. На измельченных тканях куриного эмбриона размножение вируса Ауески начинается только после 14—16 часовой латентной фазы. По истечению этой латентной фазы размножение происходит весьма быстро, и полученный вирус достигает своего максимума уже в 24—36 час разведения. Наибольшая интенсивность размножения проявляется в период от 20 до 24 часов.

9. Полученный на тканевых культурах вирус освобождается из внутриклеточного состояния только постепенно. По всей вероятности этот процесс является вследствием распада зараженных клеток.

ON THE CHEMICAL STRUCTURE OF THE CAPSULE OF B. ANTHRACIS AND B. MEGATHERIUM

By

G. IVÁNOVICS and ST. HORVÁTH

INSTITUTE OF MICROBIOLOGY OF THE MEDICAL UNIVERSITY, SZEGED

(Received, October 18, 1952)

The immunspecific hapten of B. anthracis (1) the D-glutamic acid polypeptide (2) was found also in cultures of certain non-pathogenic species belonging to Genus Bacillus (3). Under suitable cultural conditions, strains of »B. mesentericus vulgatus« (which, according to the new classification of Genus Bacillus, is identical with B. subtilis (5)) are producing an abundance of polypeptide (6). The polypeptide excreted by the cells of B. subtilis cultivated in asparagin-glycerine medium is in dissolved state. On adding copper salts to filtrates of such cultures, the soluble polypeptide is separated as a Cu^{II} salt of polypeptide of low water solubility (7). This finding indicates that the markedly acid polypeptide is not, in the morphological sense of the word, an integrant component of B. subtilis and plays no part in building up its cell-structure.

The occurrence of dissolved polypeptide in cultures of B. subtilis is in accordance with its chemical character. The great number of carboxyl groups present in the molecule are responsible for the water solubility and for the ability to form salts. With various ions (silver, mercuro, cupri etc.) appropriate salts of a low water solubility are formed in stoichiometric proportion (2), on basis of which free carboxyl groups present in the polypeptide solution can be identified. On the other hand, the polypeptide, being a building stone of the capsule of B. anthracis, B. megatherium or other bacteria, is not in dissolved state. The purified solution of D-glutamic acid polypeptide exhibits stream double refraction, indicating a considerable asymmetry of the polypeptide molecule (8). Therefore the possibility should be borne in mind that excessive polymerization of the molecule might cause a decreased water solubility and thus enables the polypeptide to take part in the morphological structure. Even if it were so, the -COOH groups would still remain in the capsule and be demonstrable by means of microchemical reactions. Elucidation of this problem was the object of the work described in the present paper.

Materials and Methods

Two virulent B. anthracis strains (A_{97} and A_{100}) have been used. Both formed encapsulated bacilli on agar medium containing 20 per cent bovine serum, when cultivated under a

20 per cent CO_2 atmosphere for 24 hours. Approximately 20 different, recently isolated strains of B. megatherium have also been subjected to studies. Data concerning the morphology and cultural properties of these strains have been reported in another paper, in which the proper circumstances of capsule production have also been discussed (6). All strains investigated produced capsules on tomato nutrient agar.

For studying decapsulation, the following method was used. Cultures of encapsulated B. anthracis and B. megatherium strains were washed off the medium with saline. 15 ml of saline was measured into each Petri dish culture. Into a series of centrifuge tubes, M/10—M/15 buffers of different pH were measured (2 ml each) and the tubes were placed in a water bath of adequate temperature. When the content of the tubes reached the temperature desired, 0,5 ml of the encapsulated bacterial suspension was added to each tube and they were kept heated for an additional 30 min. period. Different buffers (phosphate, acetate, glycine, borate) were used and tests were carried out with N/10 acetic acid, as well as with N/10 NaOH. After heating, the tubes were rapidly chilled in melting ice and centrifuged in an angle centrifuge at a rate of 6000 r. p. m. for 10 minutes. The supernatant was removed and the bacteria were resuspended in 1 ml of M/15 pH 7 phosphate buffer. Presence or size of the capsule was determined in India ink preparations.

Experimental

Microchemical examination of the capsule. Demonstration of -COOH groups of the polypeptide accumulated in the form of a capsule was the aim of microchemical reactions. Heat-fixed smears prepared in the usual way from cultures of encapsulated B. anthracis or B. megatherium were stained with various basic aniline dyes (methyl violet, toluidine blue, safranine). The B. megatherium cell itself took up the dye readily, but no capsule was visible. With stained preparations of encapsulated B. anthracis the picture was somewhat different. On staining for a few minutes with Löffler's methylene blue, the intensively stained bacteria were surrounded by a narrow, fragmented, pale red area showing no definite outlines ; it was only a slimy metachromatic halo. This metachromatic area appears to be an artificial product, since it was not seen when living bacteria were stained supravitally. If high dilutions were made of basic dyes in suspensions of washed B. anthracis or B. megatherium cells and the pH was adjusted to 5.1—8.3 with phosphate buffers, only the intensively stained outline of the bacterial cell was seen, indicating the lack of affinity of the capsule for dyes.

It is worth mentioning that some of the dyes (methyl violet, safranine, thionin) gave an intensive precipitate or turbidity with the neutral solution of the polypeptide. On the other hand, some of the basic dyes (e. g. methylene blue) did not react with the sodium salt of the polypeptide.

In order to study the affinity of the polypeptide for different aniline dyes, one drop of a 1 per cent neutral peptide solution was dried on a filter paper and the stripes were placed for 2 minutes into acetone containing 0.025 per cent of dye. The stripes were thoroughly washed with water-free acetone and dried. The acetone solved the dye out of the paper, except for the areas containing the polypeptide, in which the dye remained bound. A great variety of basic and acid aniline dyes were used in this experiment. It has been found that also acid

dyes (eosin, acid fuchsin, congo red) stained the peptide spot, probably due to the free amino group possessed by the isolated polypeptide (2). Therefore this test merits attention only because it illustrates the ability of the isolated polypeptide to bind both acid and basic dyes.

On staining a methanol-fixed B. anthracis preparation with Giemsa's solution, the capsule became clearly visible ; it is, however, not blue but red, indicating an acidophil, and not basophil character.

As it has been mentioned, the peptide forms salts with certain metals, apparently due to the -COOH groups contained in the molecule. If the capsular peptide also contained free acid groups, this ability for salt formation would be maintained. To elucidate this point, suspensions of encapsulated B. megatherium and B. anthracis were repeatedly washed with saline, centrifuged, the sediment resuspended in 1% $CuSO_4 . 7 H_2O$ and kept for 10 minutes at room temperature. The suspension was centrifuged again and the excess of copper salt was removed by repeated washing with saline. Finally, the bacteria treated as described were suspended in a 1 per cent aquaeous solution of sodium diethyldithiocarbamate and examined under the microscope. It was interesting to see that the outline of the cells was vivid yellow or pale brown ; however, *the capsule was not stained.* Similar findings were encountered in preparations dried on slides, fixed with heat and treated with copper and with the reagent.

It was striking that the aquaeous solution of the sodium salt of the polypeptide gave, according to the concentration, a milky turbidity or pale opalescence with the neutral solution of protamine sulphate. Opalescence occurred even in high dilutions of the polypeptide ; e. g. on adding 0.1 ml of 1% protamine to 1 ml of 1 : 30 000 — 1 : 50 000 dilutions of peptide, the opalescence could still be observed. On basis of this observation, it was assumed that if free acid radicals would be present in the peptide built into the capsule, they would react with protamine. If this were the case, the excess of protamine bound by the capsule should react with acid dyes. For this reason, preparations made of washed suspensions of encapsulated bacilli were fixed with heat and treated with a 0.2 per cent protamine solution for 3 minutes. After washing thoroughly with water, the preparation was stained with a 0.5 per cent aquaeous solution of acid fuchsin.

Bacteria previously treated with protamine were stained by acid fuchsin, while in the control preparations, which had not been treated with protamine before staining with fuchsin, the bacteria remained practically colourless. It was striking, however, that on protamine-acid fuchsin treatment only the cell of B. megatherium was stained, while the capsule did not bind the dye at all. Preparations made of B. anthracis and treated by the same method usually gave similar results. In some instances, however, especially when heavily encapsulated cultures were examined, on protamine-acid fuchsin treatment the periphery of

the capsule was slightly tinged, but even in this case the dye had not been taken up by the deeper parts of the capsule.

Preparations stained with solutions of basic dyes (e. g. diluted Löffler's methylene blue) following protamine treatment remained practically colourless and under the microscope only very pale, amorphous granules of no definite outline could be seen, indicating that the cells did not take up the basic dye. This observation is another evidence of the change of the cellular surface brought about by treatment with protamine.

Criteria of decapsulation. When encapsulated B. anthracis suspensions are exposed to a strong alkali (e. g. N/4 KOH), the cells lose their capsule (1). *Hanby* and *Rydon* (9) extracted the capsular substance from B. anthracis by heating at 115° C for 45 minutes. Experiments were carried out to find milder methods for extracting the capsular substance from bacteria. Heavily encapsulated specimens were suspended either in different buffers or in a weak alkali or acid, respectively, and heated in a water bath for 30 minutes. The results obtained with the heavily encapsulated A_{97} strain of B. anthracis are shown in Table I.

TABLE I

Degree of decapsulation of B. anthracis (Strain A_{97}) suspensions in different media, after heating for 30 minutes

Temp. °C	Suspended in	pH	Results	Temp. °C	Suspended in	pH	Results
70	Glycine buffer ...	12,0	+++	80	N/10 acetic acid		—
«	« « ...	8,9	+++	«	Acetate buffer ...	3,2	—
«	Phosphate buffer..	7,0	+++	«	« « ...	4,1	+
«	« « ...	5,3	+++	«	« « ...	5,0	++
«	N/10 acetic acid ..		+	«	« « ...	6,2	+++
«	Acetate buffer ...	3,2	+	«	Phosphate buffer .	7,0	+++
«	Borate buffer	12,6	+	«	Borate buffer	10,0	+++
«	N/10 NaOH		±	«	« «	12,3	++
				«	« «	12,6	+
				«	N/10 NaOH		—

Remarks: The degree of encapsulation of untreated control suspension was +++ Result. — = no capsule; ± = narrow remnants of capsule are occasionally seen; + = narrow capsule on majority of bacilli; ++ = capsule of medium size on majority of bacilli; +++ = thick capsule.

It can be seen that in N/10 NaOH, at 70° C, the capsule of bacteria is almost completely dissolved within 30 minutes. Experiments carried out with N/10 acetic acid brought similar results. When the suspension was heated at 80° C in a borate buffer of pH 12.7, the bacterial capsule was markedly damaged.

Similarly, in an acetate buffer of pH 3.2, complete decapsulation resulted at that temperature. Considerable damage of the capsule was seen in an acetate buffer of pH 4 as well, indicating that at 80° C a mild acid or alkali treatment causes decapsulation of B. anthracis within 30 minutes. During treatment the size of the capsule is gradually decreased, indicating that decapsulation proceeds from the surface toward deeper layers and is not instantaneous.

Similar conditions are required for decapsulating B. megatherium. The experiment carried out with the encapsulated strain No 101 showed that complete decapsulation was brought about in a pH 3.2 acetate buffer at 80° C. Partial decapsulation has been observed at pH 4 to 5, but at pH values nearer to neutral no capsular damage was caused by heating.

Discussion

The various methods recommended for staining the capsule of B. anthracis will not be discussed in the present paper ; in this connection we only wish to refer to the monograph by *Sobernheim* (10). The ordinary technique of staining, in which basic aniline dyes are used, is not suitable for demonstrating the capsule of that organism. It is also known that even capsular staining techniques are less effective for demonstrating the capsule of bacteria suspended in water than they are if preparations made of tissue fluids of infected animals or of bacterial cultures containing protein are examined. There is a great variety of capsular staining methods. In some of them, overstaining and differentiation with e. g. diluted acetic acid is applied, while in others staining is carried out with intensive heating or with impregnation (e. g. with an $AgNO_3$ solution). With Giemsa's stain, as could be seen, the capsule becomes a light pink, indicating an acidophil character. It is also known that, as we have also experienced, on intensive staining with Löffler's methylene blue the capsule of B. anthracis appears as a metachromatic halo of irregular shape. All these findings indicate that the capsule of B. anthracis takes up basic aniline dyes only reluctantly or not at all. The principle in the background of effective methods appears to be impregnation or adsorption and staining is apparently not a consequence of an ionic linkage between capsule and dye. Dye uptake of B. anthracis and B. megatherium capsules has been studied in heat fixed preparations, as well as with living organisms. In both cases negative results were obtained when using diluted basic aniline dyes, although the dyes used were capable of reacting with the polypeptide, as evidenced by the precipitate formed or by the discoloration of the protein spot fixed on paper. Vital staining methods and fixed preparations uniformly indicated that the capsule of neither bacilli bound Cu^{II} ion, in spite of the fact that Cu^{II} precipitates the protein from its aquaeous solution by forming copper-polypeptide salts of a low water solubility.

The present view attributes the staining of bacteria to ionic exchange *[Dubos* (11)]. Acid fuchsin stains bacteria only in acid (pH 3) media (12, 13). The amphoteric bacterial plasm takes up acid fuchsin, that acts as an anion, only below its isoelectric point. We have found that after treatment with protamine a neutral medium also suffices to enable bacteria to take up acid fuchsin, but not to stain with basic dyes. Treatment with protamine would therefore cause a shift of the isoelectric point toward the basic reaction, rendering the cell capable of binding dyes acting as anions. The capsule, however, does not exhibit such characteristics since it is not stained. It is only a slight superficial discoloration that could be observed occasionally after protamine treatment, indicating that the capsule contains no acid groups reacting with the dye. On the other hand, the dissolved peptide reacts with protamine, as it is shown by the turbidity that results when solutions of the two substances are mixed.

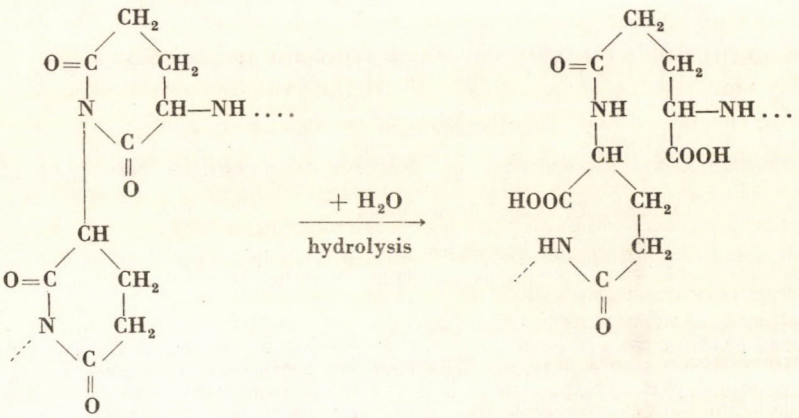
For the occasional discoloration seen after acid fuchsin-protamine treatment the dynamic state of the capsule might be responsible. The capsular substance at the cellular surface is in the gel state. This undergoes gradual dissolution at the periphery (14) and thus the occurrence of acid groups at the periphery is not necessarily indicative of their presence in deeper layers as well. In the case of B. megatherium it was only the cell that absorbed the dye after protamine treatment, while the capsule was not stained at all.

Microchemical reactions of B. anthracis and B. megatherium have shown that there are no free carboxyl groups in the capsular D-glutamic acid-polypeptide. The absence of free -COOH groups accounts for the fact that the polypeptide, although excellently soluble in water when isolated, can still play an active part in building up the capsule. The water solubility of this polypeptide is greatly diminished when carboxyl groups are bound, e. g. in an ester linkage by diazomethan (15).

Structural proteins (collagen, myosin etc.) possess markedly asymmetric molecules ("fibrillary proteins"). The streaming double refraction of the solution of purified glutamic acid polypeptide is indicative of marked molecular asymmetry. Recent observations concerning the capsule of B. megatherium (16) support the view that the structure of the peptide is of a fibrillary character. A variety of theories may be brought forward for explaining the insolubility, i. e. the structural protein character, of the capsular peptide of both bacteria. One of the possibilities is the formation of salts of a low solubility in water with some unknown base. However, no such basic substance could so far be detected in the capsule of B. anthracis in investigations that have been carried out for a longer period of time (unpublished data). It may also be assumed that the carboxyl groups are bound in ester or acidamide linkages. The latter assumption, however, is refuted by two facts, i. e. decapsulation by very mild methods, and by the absence of greater amounts of ammonia in extracts prepared from encapsulated B. anthracis as compared to that found in extracts of non-capsulated

variants. The presumption of the existence of ester linkages could not be rejected so far.

In our opinion it appears likely that by the folding of peptide chain intramolecular linkages are brought about. *Kovács* and *Bruckner* (17) have proved that the D-glutamic acid polypeptide contains gamma and not alpha linkages. It may therefore be assumed that all carboxyl groups are bound as secondary acidamides in the genuine polypeptide and that the system of gamma glutamyl linkages is formed only in the course of hydrotyte fission taking place during isolation.



The fact that even very mild hydroly is brings about decapsulation and by that means the capsular peptide is converted into a substance containing free carboxyl groups, appears to justify such an assumption.

Summary

Microchemical reactions have shown that D-glutamic acid polypeptide participating in the structure of the capsule of B. anthracis and B. megatherium contains no free -COOH groups. This finding explains why the polypeptide of excellent water-solubility is capable of fulfilling the part of structural protein. Many theories may be brought forward for explaining the chemical structure of the capsule liable to dissolution even by mild procedures.

LITERATURE

1. *Tomcsik, J.* and *Szongott, H.:* Zeitschr. Immunitätsf., **76,** 214 (1933).
2. *Iványovics, G.* and *Bruckner, V.:* Zeitschr. Immunitätsf., **90,** 304 (1937).
3. *Iványovics, G.:* Zbl. f. Bakt., **138,** 211 (1937).
4. *Bergey's* Manual, 6th Edition.
5. *Iványovics, G.:* Zbl. f. Bakt., **159,** 178 (1953).

6. *Ivánovics, G.:* Zbl. f. Bakt., **142,** 52 (1938).
7. *Ivánovics, G.* and *Erdős, L.:* Zeitschr. Immunitätsf., **90,** 5 (1937).
8. *Bruckner, V.* and *Kovács-Oskolás, M.:* Acta Chem. et Phys. Univ. Szeged, **1,** 144 (1943).
9. *Hanby, V. E.* and *Rydon, H. N.:* Bioch. J., **40,** 297 (1946).
10. *Sobernheim, G., Kolle-Kraus and Uhlenhut:* H. Path. Mikroorg., **III,** 2. 1041.
11. *Dubos, R. J.:* The Bacterial Cell, 1949.
12. *McCalla, T. M.* and *Clark, F. E.:* Stain Technology **16,** 95 (1941).
13. *Tolstoouhov, A. V.:* Stain Technology **4,** 81 (1929).
14. *Pirie, N. W.:* The Nature of the Bacterial Surface, Oxford, 1949.
15. *Kovács, J., Bruckner, V.* and *Kovács, K.:* J. chem. Soc. In print.
16. *Ivánovics, G.* and *Horváth, St.:* Naturwissenschaft **39,** 455 (1952).
17. *Kovács, J.* and *Bruckner, V.:* Research **5,** 194 (1952).
18. *Bruckner, V.* and *Kovács, J.:* Personal communication.

ХИМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА КАПСУЛЫ B. ANTRACIS И B. MEGATHERIUM

Д. Иванович и И. Хорват

Патологический и микробиологический институт медицинского университета, Сегед.

Резюме

Авторы исследовали при помощи микрохимических реакций химическое поведение D-глютаминовой кислоты — полипептида, участвующего в построении капсулы B. anthracis и B. megatherium.

Капсула вышеупомянутых бактерий не окрашивается разбавленным основным анилиновым красителем, и не связывает Cu^{II} — ионов, несмотря на то, что очищенный полипептид вступает ими в реакцию. Обрабатывая раствором протамина мазки, изготовленные из культур B. anthracis и B. megatherium с капсулами, а затем окрашивая их кислым фуксином, сами бактерии окрашивались, но капсулы остались бесцветными. Окраской по Гимса капсула B. anthracis окрашивается в красный цвет, что наряду с вышеприведенными данными указывает на то, что капсула этой бактерии не имеет кислый характер. На основе этих наблюдений понятно, что хорошо растворимый в воде D — глютаминовая кислота — полипептид, пригоден для выполнения роли структурных протеинов. В полипептиде, встроенном в капсуле не имеются свободных-COOH групп, но это вещество выделается из капсулы уже вследствие слабых воздействий. Все сказанное указывает на то, что хорошо растворимый в воде полипептид, сильно кислого характера, находится в бактериальной клетке в другой химической форме, чем он получается после выделения. Для объяснения вопроса о том, каким образом полипептид соединяется за счет непрочно связанных COOH-групп с бактериальными клетками, имеются несколько возможностей. По мнению авторов, одним из этих объяснений может быть складчатость пептидной цепи. А именно, вследствие складчатости пептидной цепи, внутри молекулы могут возникать вторичные связи амидной кислоты, вызывающие кроме прекращения кислотного характера пептида также и уменьшение его растворимости.

IMMUNOLOGICAL CONDITIONS OF OUR TRANSPLANTABLE MOUSE CARCINOMA STRAIN

By

GY. PUTNOKY, J. KERESTÉLY, F. GYERGYAY and I. BUSTYA

INSTITUTE OF MICROBIOLOGY OF THE MEDICAL AND PHARMACEUTICAL HIGH SCHOOL, AND INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH, TARGU—MURES

(Received, September 17, 1952)

At the end of the last and the beginning of the present century it had already been observed by the first authors studying the problems of transplantable animal tumours that in some of the animals, inoculated with tumours, the transplanted cells produce proliferating, constantly growing neoplasms which finally kill the animal. In others the new tumour, having attained a certain size, discontinues its growth and regresses, while again in other animals the transplanted tumour cells show no sign whatever of either multiplication or proliferation. It had further been proved that if the tumour cells transplanted into animals fail to develop, or if the growing neoplasm, after having attained a certain size, begins to regress by itself, or if the already developed neoplasm is forced to regress by an artificial intervention, then inoculating the animals again with the tumour will remain without any result, such transplantations showing no sign of growth. Since these phenomena are very similar to the immunological processes observed in connection with bacterial infections, the concept of an immunity to transplantable tumours has been developed. It is, however, certain that resistance to bacteria and processes antagonizing tumour formation are not of an entirely identical nature so that it is more correct to speak of a resistance and not of an immunity to tumours. Yet the latter term has been adopted in the literature and from sheer habit one usually speaks about immunity to tumours instead of resistance to tumours. It must be emphasized in addition that similarly to the immunity to bacterial infections, at present it seems as if not only the antigen entering the organism, and the reticulo-endothelial system influenced by the antigen, were responsible for the increase of resistance to neoplastic growth. We rather believe that in the first line the antigens exert an appropriate stimulating action upon the nervous system and in consequence of the stimulation the reticulo-endothelial system produces, under the direction and control of the central nervous system, the necessary antibodies.

In previous reports it had repeatedly been pointed out that resistance to tumours may be either natural or acquired.

I. Natural or congenital resistance manifests itself with the following phenomena. *a)* Every animal is highly resistant to the tumour of another species ; *b)* animals from every country manifest a different degree of resistance and susceptibility to tumours of animals from other countries ; *c)* every variant of an animal species shows a strong resistance to tumours of the other variants of the same species ; and finally, *d)* individual resistance, which becomes evident if animals originating from the same breed have been inoculated with a tumour and in some of the animals the transplantation yields a positive result, while in others the tumour either fails to develop or it regresses. According to present knowledge, individual resistance is influenced by the following factors. *(i)* age, *(ii)* sex, *(iii)* season of the year, *(iv)* climate, *(v)* food, *(vi)* type and intensity of light, *(vii)* certain hereditary factors. II. Acquired immunity develops if appropriate antigens enter the animal's organism. The antigen may consist of a tumour tissue but also of embryonal skin or of an entire embryo ; these antigens are producing a very reliable, almost an absolute immunity. A considerably lower grade of resistance may be produced with the introduction of non-tumourous tissues such as blood, liver, spleen, placenta, testicles, lymph node, thymus. Growing and then spontaneously regressing tumours, tumours made to regress by an artificial intervention, finally tumour tissues or tumour cell suspensions introduced into the animal organism, may give rise to a very reliable immunity to tumours foreign to the organism. According to our observations, there are tumours which have a very high immunizing capacity against both their own selves and other tumours of the same species. Other tumours are capable of producing immunity against their own selves only ; some tumours are of a very high, others of a lesser sensitivity to the increase of resistance produced by foreign tumours. Rapidly growing, virulent tumours, exhibiting a high ratio of successful takes are usually less capable of immunizing than slowly growing tumours of a minor virulence. Also, animals may easier be protected against the latter than the former type. The increase of resistance begins on the 4th day after the antigen had been introduced, it becomes marked on the 10th day and lasts from 10 to 12 months. It seems as if this immunity were not transferable in a passive way.

Formerly, partly in Hungarian and partly in foreign institutes we were engaged for years with studying the problems of immunity to tumours and the laboratory diagnosis of tumours. In both human and animal tumours we were searching for the specific antigen, on the action of which specific antibodies are produced in the human and animal organism, and also for the specific antibodies present in the organism. The results attained were reported in several papers. There remained, however, a number of conceptions which needed further investigation. We wished to continue the above experiments when we succeeded in breeding and in keeping viable our mouse carcinoma strain marked »M. I.«

It is certain that transplantable animal tumours are of a substantially different nature than spontaneous animal and human tumours. In case of spontaneous tumours, the growth appears locally only after the nervous system and the metabolism controlled by it have been affected. On the other hand, transplantable tumours are introduced into the organism of healthy animals and it is in consequence of the growing tumour that the organism becomes affected. The main advantage of working with transplantable tumours consists in the circumstance that by using such tumours both the tumour-bearing organism and tumour-bearing material may be observed at optional time and in optional quantity. Thus it becomes possible to undertake investigations and observations that could not be performed on organisms in which a tumour had spontaneously developed. Moreover it is certain that with the growth of the inoculated tumour the host animal becomes indeed tumour-affected, as it could be proved with our own experiments [*Putnoky* and *Sümegi* (1)]. It is due to these facts that transplantable tumours have been extensively employed in oncological research work for more than 50 years. This experimental work added many valuable data to our knowledge of malignant tumours. Yet if one would suppose that the tumour developing after transplantation, would, under the influence of the living agent contained in the transplant, originate from the cells of the host organism, then the great difference between transplantable and spontaneous tumours would vanish at once. Still, it is evident that neoplasms produced by cancerogenous substances are nearer to human tumours, in particular to occupational tumours, than transplantable tumours. The more so, if it is presumed that both kinds of tumour are slowly produced in normal organisms on the action of chemical substances in such a way that first the organism as a whole, i. e. both the nervous system and the metabolism, become affected and the growing tumour represents a local manifestation of the general illness. If one adopts the view that the tumour-producing effect of chemical substances consists, besides damaging the central nervous system and the metabolism controlled by it, in the activation of a latent material of virus or virus-like character, then the two species of transplantable tumours, i. e. the one elicited by chemical substances and the other by viruses or virus-like materials, will again show a great resemblance.

Experimental

In the course of three years we had the opportunity to observe and to attempt the transplantation of 33 spontaneous mouse tumours and of 2 spontaneous rat tumours. The 2 rat tumours were benign adenomas and proved to be intransplantable. Each of the 33 spontaneous mouse tumours were malignant and from among them 8 proved transplantable ; 2 of them could be kept viable through more than two passages each. A tumour strain marked »M. II«, was

transplanted through 3, another strain, marked »M. III.«, through 7 passages, whereafter these strains have been lost. Actually a tumour strain marked »M. IV.« lives in the seventh, and two strains, one marked »M. V.« and another »S. II.«, in the fifth generation. Our cancer strain »M. I.« has been kept through 55 generations.

With the last named tumour strain a total of 1596 mice have been inoculated, 655 of these being experimental animals, i. e. pre-treated in different manners, and 941 control animals. Out of the 941 control animals tumours have grown in 618 (66 per cent). 118 animals succumbed before due time, while 213 mice (22 per cent) failed to develop a tumour. In the animals inoculated the tumour became palpable usually on the 6th to 8th day after transplantation. The life-span of tumour-bearing animals was 15 to 18 days after inoculation, and the neoplasms developed weighed from 2 g to 7 g. The histopathological diagnosis in the first passage was cylinderocellular adenomatous carcinoma, and medullar or anaplastic carcinoma from the third passage onwards. We did not succeed in transplanting this strain into rats with the free method. This may have been due to the fact that the cells are not of a very high »virulence« as demonstrated also by the 66 per cent ratio of takes. It was, however, just on account of this very property that the strain seemed suited for the purpose of our immunological investigations, and it was exactly for such purposes that we endeavoured to breed an appropriate transplantable animal strain. At the beginning, during the first 6 passages, we did not start experiments, wishing to wait until the initial biological unstabilities had been eliminated and until we had become acquainted with the biological behaviour of the tumour strain, which was thus employed for experiments only from the 7th generation onwards. Transplantation was carried out by inoculating a cell-suspension prepared with physiological salt solution. The concentration of the suspension amounted to about 20 per cent and a quantity of 0,4 ml was inoculated into the subcutaneous connective tissue of the back. Subsequent to inoculation the animals were kept one by one in glass containers of 1 liter capacity, containing some wood shavings. Their food consisted of oats, milk and of dough prepared of mixed flour. Usually 8 healthy control animals and 8 pre-treated animals were inoculated in every experiment. For the sake of control it was endeavoured to perform each experiment in duplicate. The pace of the experiments as well as the employment of a greater number of animals were greatly hindered by the constant shortage in animals.

In the first series of experiments it was studied whether or not animals originating from spontaneous tumour-bearing parents were more susceptible to tumour formation than descendants of normal animals. It appeared that both kinds of mice showed the same frequency ratio of takes, i. e., offsprings of tumour-bearing parents revealed no increased susceptibility to transplantable tumours.

In a second series of experiments we wished to study whether animals which had been inoculated with spontaneous tumours but had subsequently developed no tumour, were immune to transplantable cancer. For that purpose 12 animals that seemed to be immune and 16 healthy control animals were inoculated with the tumour strain. (See Table I.)

TABLE I

Immunizing effect of transplanted spontaneous tumours

Negative animals				Control animals				
Inoculated ..	+	—	?	Inoculated	+	—	?	8/12 : 14/16
12	8	4	0	16	14	1	1	1 : 2

According to the results obtained, tumour-growth was evidenced in 8 out of 12 spontaneous tumour-negative animals, and in 14 out of 16 control animals, so that the immunity of the former ones proved to be of medium intensity.

In a third series of experiments it was studied whether animals which had been inoculated with transplantable cancer and had proved negative, were in fact immune to tumours. We inoculated tumours on three occasions into a total number of 24 negative, and 24 control animals. (See Table II.)

TABLE II

Immunizing effect of the transplantable tumour strain »M. I.«

Negative animals				Control animals				
Inoculated	+	—	?	Inoculated	+	—	?	0/24 : 19/24
24	0	23	1	24	19	3	2	0 : 19

None out of the 24 negative animals developed cancer, while from the 24 control animals 2 succumbed before due time, and 19 developed malignant tumours, i. e. the negative animals were indeed absolutely resistant to the transplantable tumour.

In a fourth series of experiments we wished to answer the question, whether the acquired resistance to transplantable tumour was inheritable. For this reason we inoculated tumours on five occasions into 39 first descendants of tumour-negative parents, and simultaneously into 40 descendants of healthy mice. (See Table III.)

Tumours were developed in 7 out of the 39 first descendants of negative parents, while in 25 out of 40 control animals. This proves that first descendants

TABLE III

Immunity of first descendants of negative animals

Experimental animals				Control animals				
Inoculated	+	—	?	Inoculated	+	—	?	7/39 : 25/40
39	7	24	8	40	25	5	10	1 : 3,5

of tumour-resistant parents are in about 80 per cent immune to transplantable cancer, showing that a strong resistance may be transmitted.

Furthermore, the tumour was inoculated into 24 second descendants of tumour-negative parents and into 24 control animals. (See Table IV.)

TABLE IV

Immunity of second descendants of negative animals

Experimental animals				Control animals				
Inoculated	+	—	?	Inoculated	+	—	?	8/24 : 12/124
24	8	8	8	24	12	5	7	1 : 1,5

After inoculation, a cancerous growth could be registered in 8 out of the 24 animals of the second generation and in 12 out of 24 control animals; thus even in the second generation the descendants of tumour-negative parents showed a lower susceptibility to the tumour, than the control animals. The inherited resistance to transplantable tumours seems gradually to cease in the second or third generation.

In a fifth series of experiments it was investigated whether the increase in acquired resistance to the cancer strain »M. I.« was similarly efficacious against the strain »M. III.«. Cells of the »M. III.« tumour were inoculated on three occasions into 24 animals that had proved immune to »M. I.« cancer, and into 24 control animals. (See Table V.)

TABLE V

Immunizing effect of tumour strain »M. I.« against tumour strain »M. III.«

Negative animals				Control animals				
Inoculated	+	—	?	Inoculated	+	—	?	6/24 : 16/24
24	6	17	1	24	16	6	2	1 : 2,5

Tumour growth was observed in 6 out of 24 »M. I.«-negative, while in 16 out of 24 control animals. This means that the acquired immunity to the »M. I.« tumour is sufficiently effective to tumour »M. III.«, although nearly not so intensive as against the original strain.

Continuing the immunological cross experiments, in a sixth series it was studied how animals resistant to the strain »M. III.« would behave against cancer »M. I.«. »M. I.« tumours were therefore inoculated into 24 »M. III.«-negative and 24 control mice. (See Table VI.)

TABLE VI

Immunizing effect of tumour strain »M. III.« against tumour strain »M. I.«

Negative animals				Control animals				
Inoculated	+	—	?	Inoculated	+	—	?	8/24 : 13/24
24	8	15	1	24	13	7	4	1 : 1,5

Tumour-formation was recorded in 8 negative and in 13 control animals ; thus the increase of resistance to tumour »M. III.« was to a certain degree efficacious also against tumour »M. I.«. That means that our cancer strain »M. I.« offers a high degree of immunity against itself, while it is able to produce a minor degree of resistance to other tumour strains, and, to a certain degree, it is susceptible to the increase in resistance induced by a different tumour strain.

In a seventh series of experiments it was observed, how animals resistant to inoculation with cancer produced by tar would behave against our »M. I.« tumour. For this purpose carcinoma cells were inoculated into 6 negative and 8 control animals. (See Table VII.)

TABLE VII

Immunity to »M. I.« tumour of animals resistant to tar tumours

Negative animals				Control animals				
Inoculated	+	—	?	Inoculated	+	—	?	1/6 : 8/8
6	1	5	0	8	8	0	0	1 : 7

As shown in Table VII, a neoplasm developed in 1 out of 6 pre-treated, while in all of the control animals. Thus animals resistant to tar tumours proved to be immune to the transplantable tumour as well.

In the eighth series of experiments it was studied whether or not animals immune to transplantable tumours would be immune also to the tumour-inducing effect of tar. In order to answer this question 40 negative and 40 control animals were painted with products of Resica tar, possessing an intensive cancerogenous effect. (See Table VIII.)

By the time the animals had reached the tumorous age, 1 of the pre-treated and 22 of the control animals evidenced a tumorous growth, i. e. the

TABLE VIII

Development of tar tumours in animals immune to the »M. I.« tumour and in control animals

Immune animals				Control animals				
Treated	+	—	?	Treated	+	—	?	17/40 : 22/40
40	17	0	23	40	22	0	18	1 : 1,3
Malignant	12	0	23	Malignant	15	0	18	

increase of resistance induced by a transplantable tumour was not able to inhibit the development of a tar tumour.

In a ninth series of experiments it was endeavoured to determine whether animals which had not developed a tumour after inoculation with a cell-free filtrate would be immune to transplantable tumours. For that purpose tumour cells were inoculated in two instances into 16 control animals and into 19 such animals that had unsuccessfully been inoculated with the cell-free filtrate of the »M. I.« tumour, prepared by filtering through a Chamberland L_5 candle filter or a Seitz filter. (See Table IX.)

TABLE IX

Immunity to transplantable tumours of animals that had unsuccessfully been inoculated with tumour filtrate

Negative animals				Control animals				
Inoculated	+	—	?	Inoculated	+	—	?	8/19 : 11/16
19	8	9	2	16	11	1	4	1 : 1,5

Tumours have grown in 8 out of 19 filtrate-negative and in 11 out of 16 control animals. This proves that the inoculated filtrates were capable of producing a certain degree of immunity.

In a tenth series of experiments it was studied whether normal cells of healthy animals were capable of increasing the resistance in our animals. This time a liver cell suspension had been administered to 15 animals in two experiments and after an interval of 10 days tumour cells were transplanted into these pre-treated, as well as into 16 control animals. (See Table X.)

TABLE X

Immunizing effect of normal cells

	Pre-treated animals				Control animals				
	Treated	+	—	?	Treated	+	—	?	
Liver ...	15	4	9	2	16	11	5	0	8/44 : 35/48
Kidney ..	13	2	10	1	16	12	4	0	1 : 4
Spleen ...	16	2	14	0	16	12	4	0	
Total ...	44	8	33	3	48	35	13	0	

As a result of these experiments, a tumour developed in 4 out of 15 animals pre-treated with liver cells, while in 11 out of 16 control mice. Of 13 animals pre-treated with kidney cells, only 2, of 16 pre-treated with spleen cells, only 2 developed a tumour, in contrast to the 16 controls of which 12 showed a neoplastic growth. This means that cells of the liver, kidney and spleen of healthy animals are capable of increasing considerably the resistance to the transplantable tumour.

As it became evident from the experiments that it is possible to induce immunity to our transplantable tumour both in a natural way and by artificial intervention, it was endeavoured to study the mechanism of this increased resistance or immunity. The first question to answer was, whether or not the blood serum of immune animals had an immediate action on the tumour cells. Therefore, in an eleventh series of experiments a suspension was prepared from the tumour cells by adding blood serum of immune animals instead of physiological salt solution. After allowing to stand for 5 to 30 minutes the suspension was inoculated into white mice. The control animals were administered tumour cells suspended in blood serum of normal mice. (See Table XI.)

TABLE XI

»Takes« of tumour cells treated with blood serum of immune animals

Blood serum of immune animals				Blood serum of control animals			
Inoculated	+	—	?	Inoculated	+	—	?
16	11	5	0	16	13	2	1

According to the results, tumour cells treated with blood serum of immune animals elicited carcinomatous growth in 11 cases out of 16, while cells suspended in normal serum in 13 cases out of 16. Thus the blood serum of immune animals seems to have no influence on the tumour producing capacity of tumour cells.

In a twelfth series of experiments it was tried to follow the fate of tumour cells both in healthy and in immune animals. On two occasions tumours were implanted into both immune and normal animals. One immune and one control animal was sacrificed every day between the 2nd and the 13th day following transplantation, the area of transplantation was excised and histopathologically examined. (The examinations were made by *Dr. F. Gyergyay*, of the Institute of Pathological Anatomy.) According to the findings, the tumour develops both in normal and in immune animals with the same intensity until the 4th to the 5th day following the inoculation, showing first an expansive growth until the 5th day when infiltration of the muscle tissue begins. From the 5th day on in the control animals the tumour is rapidly growing and its infiltrative character becomes more and more predominant. In immune animals the cancer

stops growing from the 5th day on, infiltration of the surrounding tissues is missing and on the 6th or 7th day confinement and encapsulation of the tumour by connective tissue begins and the encapsulated tumour cells gradually die off. It seems therefore that the immune organism, which in the beginning permits the tumour to grow, later on develops a reaction, in consequence of which the tumour becomes encapsulated and its cells die off.

Discussion

The observations may be summarized as follows. Descendants of animals bearing spontaneous tumours are not more susceptible to transplantable tumours than descendants of normal animals. On the other hand, animals which had been inoculated with spontaneous tumours but which subsequently have not developed a tumour, show an immunity of medium intensity (1 to 2) to our transplantable tumour »M. I.«. The tumour strain »M. I.« is capable of producing absolute immunity (0 to 19) against itself and a medium immunity (1 to 2,5) to the strain »M. III.«, but does not produce any increase in resistance to the cancerogenous effect of tar (1 to 3). Immunity produced by the strain »M. I.« is intensive (1 to 3,5) in the first descendants of immune parents and of a considerable degree (1 to 1,5) in the second descendants. Tumour strain »M. III.« induced only a weak immunity (1 to 1,5) to »M. I.« carcinoma, and the cell-free filtrate of the strain »M. I.« increased to the same degree the resistance (1 to 1,5) to his own cells. Inoculation of both tar cancer and normal cells produced an adequately high immunity (1 to 7, and 1 to 4, respectively) to the tumour »M. I.«. Immunity is not due to the presence in the blood serum of antibodies detrimental to the tumour cells, since in immune animals tumour cells are well propagating until about the 5th day. After this period a rapid encapsulation of the growing tumour by connective tissue and subsequent dying off of cancer cells occurs.

How should the experimental results be explained and what conclusions may be drawn from them? If one presumes that beside the damage exerted on the nervous system and the metabolism controlled by it, only the proliferation of the inoculated tumour cells plays a role in the formation of the transplantable neoplasm, then the immunizing effect of the spontaneous, transplantable and tar tumours may be easily understood. In this case, together with the transplanted tumour tissue, an adequate amount of antigen is being carried into the animal organism, which antigens, by influencing the nervous system, induce an increase in resistance to the tumour strain. According to *Zilber* and *Nartsissov* (2), in malignant tumours antigens which are homologous and heterologous for the organism, and specific and non-specific for the tumour, are present. On the action of these antigens the organism produces specific antibodies inhibiting the growth of the inoculated tumour cells.

It is more difficult to explain why normal cells too were able to induce an increase in resistance to our tumour. This observation is not unparalleled in the literature. In 1938, *Gay* (3) reported that he succeeded in producing with normal hen tissue an immune serum against the virus of *Rous*' sarcoma, and with normal duck tissues another immune serum against the virus of *Fujinami*'s sarcoma. On the basis of his investigations, *Gay* presumed that the *Rous*' sarcoma virus contains a component present also in normal hen tissue. »Reminding property« is the term by which he named the quality of *Rous*' sarcoma to be neutralized by a serum produced against normal hen tissue. Admitting that immunity to tumours is not strictly specific to tumours, there is reason to believe that antibodies, produced under the influence of antigens present also in normal tissues, are capable, by the intermediary of the nervous system, of inhibiting the multiplication of tumour cells. If the resistance to tumours is considered as a process of specific nature, it may be presumed that the specific antigen of the tumour, or at least a substance of very similar properties, must be present in normal tissues. This presumption, however, needs to be proved.

It is even more difficult to interpret the observation that animals could be immunized against our tumour strain also with the cell-free filtrate of the tumour. In this case the increase in resistance might be attributed to the effect of antigens present in the filtrate. In our experiments the cell-free filtrate of the tumour exerted an inhibiting action on the development of tumours produced by the transplantation of tumour cells. This observation is remarkable when compared to the experience of *Zilber* and *Baidatsov* (4) who found that hens immunized with formaldehyde-treated *Rous*' virus became immune to tumours produced by inoculation of the virus but remained susceptible to transplanted tumour cells. Reversing the experiment, animals pre-treated with tumour cells became immune to the transplantation of such cells, but not to inoculation with the virus. In other words, immunity to virus is not accompanied by immunity to cells and vice versa. The fact that immunity to our tumour strain could be attained by a cell-free filtrate as well, may suggest that, beside the altered function of the nervous system and the metabolism controlled by it, it is not solely the proliferation of transplanted cells that may play a role in the formation of tumour, but there must be some other factor involved, whose antigens are present in the cell-free filtrate.

Most remarkable in this connection were the observations which revealed that the cells of our transplantable tumours were not capable of producing immunity to tar carcinoma.

This might be explained partly by the fact that the immunity of the animals, developed under the antigenic effect of the tumour cells, decreased considerably during the relatively long growth period of tar tumours. It might,

however, also indicate that the formation of the tumour was not due to the immediate effect the tar exerted on the cells, since our transplantable tumour ought to have provided immunity to the appearance of such a tumour. On the other hand, if, through the mediation of the nervous system and the metabolism controlled by it, the tar would activate some kind of a latent filterable factor present in the organism, then the tumour cells were evidently not capable of inhibiting the formation of such a tumour, considering that the inoculated cells are uncapable of producing an adequate immunity to filterable agents. Admitting that latent filterable factors capable of producing a neoplasm may be latently present in normal animal tissues, one may easily explain the fact that immunity to our tumour could be attained with normal cells. In this case the specific antigen contained in normal tissue would correspond to the filterable factor present there in a latent form, since, according to *Zilber* (5), the specific antigens of tumours are practically identical with the nucleoprotein of the tumour-producing viruses. These suppositions could, however, be proved only if a filterable factor could be detected both in our transplantable tumour and in normal tissue. These were the observations which induced us to study the aetiology of our transplantable tumour strain.

Another question to be raised is, whether or not there are brought about in the human organism immunebiological processes directed against tumours. Our opinion concerning this question has been discussed in detail in one of our previous papers. At present, only the following should be mentioned. There is no reason to believe that, as what regards their immunological behaviour, human tumours would differ from animal tumours. It is improbable that the human organism would be entirely defenceless to the attack of malignant tumours and that it should in no way be able to protect itself against them. The self-defence of the human organism against tumours is clearly indicated by the few well established but infrequently occurring cases of spontaneous healing from cancer, by the rare healings following palliative operations, by regression of metastases after removal of the primary tumour, as well as by histopathological observations showing that tumour cells which had been carried into the lungs or into the lymph nodes may die off. It seems that immunological reactions are brought about mainly by those surgical interventions in the course of which a major amount of tumour antigen is liberated in the organism. Unfortunately, these immunebiological processes are in most cases much too weak to involve by themselves the healing of the tumour. If we were to succeed in protecting the organism from all those unfavourable environmental influences which, by affecting the nervous system and the metabolism controlled by it, give rise to the appearance of tumour, furthermore, if in the formation of tumours such factors too would participate, against which the resistance could be effectively increased, we were in a position to prevent the formation of the majority of tumours. In addition, by increasing the resistance to tumour cells post-

operational recurrences and metastases could be inhibited. This would mean a great advance in the fight against malignant tumours.

Summary

Immunity to our transplantable mouse carcinoma was attained by previous treatment with spontaneous, transplantable and tar tumours. The phenomenon may be explained by the fact that, together with the tumour cells, a sufficient amount of antigens, homologous and heterologous for the organism, and specific and non-specific for the tumour, were carried into the organism where they produced an appropriately intensive increase in resistance.

The fact that immunity to our tumour could be attained by normal cells as well, cannot be explained except by supposing either that the resistance to tumours is a process of non-specific nature, or that normal cells too contain a substance identical with the specific antigen of the tumour, or at least some material of a very similar nature.

Increased resistance to the tumour could be produced also by means of a cell-free filtrate. This may have been due to the presence of the appropriate antigen in the cell-free filtrate. Immunity to viruses being, however, generally ineffective against cells, and immunity to cells being in most cases ineffective against viruses, in the formation of transplantable tumours, beside the altered function of the nervous system and of the metabolism influenced by it, factors other than the proliferation of transplanted cells may also play a role, most possibly some filterable factor.

Finally, there is reason to suppose that the cells of our transplantable tumour may have failed to produce immunity to tar carcinoma because the formation of the latter is not a problem of mere cell-proliferation, this kind of tumour being developed when the tar, through the intermediary of the nervous system and the metabolism controlled by it, has activated a filterable factor present in a latent state.

According to our experiments, animals that failed to develop a neoplasm after inoculation of spontaneous tumours, of transplantable mouse carcinoma marked »M. III.«, and of tar tumour, were found to be immune to our mouse carcinoma strain marked »M. I.«. In cases when animals have shown no growth of »M. I.« mouse carcinoma, or if so, the growth regressed later on, the animals proved to be resistant to mouse carcinoma marked »M. III.«, yet they did develop tar tumours. We succeeded in immunizing animals against mouse carcinoma marked »M. I.« by inoculating a suspension of normal liver, kidney, and spleen cells, further a cell-free filtrate of the »M. I.« tumour.

LITERATURE

1. *Putnoky, J.* and *Sümegi, St.:* Works of the Society of Hungarian Pathologists (1934 1935).
2. *Zilber, L. A.* and *Nartsissov, N. V.:* Доклады акад. наук СССР LXIV. 84 (1949).
3. *Gay, N.:* cited by Zilber, L. A.: Virus-aetiology of malignant tumours. Medgiz Moscow (1946).
4. *Zilber, L. A.* and *Baidatsov, Z. L.:* Успехи Соврем. биол. ii XXVII. 2 (1949)
5. *Zilber, L. A.:* Доклады акад. наук СССР LXV. 97 (1949).

ИММУНИТЕТ ПО ОТНОШЕНИЮ К ПЕРЕСАЖИВАЕМОМУ ШТАММУ РАКА МЫШЕЙ

Д. Путноки, Я. Керештель, Ф. Дьердяи и И. Буштя

Микробиологический кафедр медицинского и фармакологического института высшег образования, и Институт здравоохранения, Таргу Муреш

Резюме

Согласно опытам авторов, потомки животных с самопроизвольными опухолями не обладают более выраженной восприимчивостью к пересаживаемым опухолям, чем потомки здоровых животных; в противоположность этому животные, привитые спонтанной опухолю, и оказывающиеся негативными, проявляли среднюю резистенцию (1 : 2) против пересаживаемой опухоли со знаком »M. I.«. Опухолевий штамм со знаком »M. I.« может вызывать абсолютный иммунитет против самого себя (0 : 19), вызвал средний иммунитет (1 : 1,5) к штамму »M. III.«, но не вызывал повышение сопротивляемости к канцерогенному действию дегтя (1 : 1,3). Иммунитет, вызванный опухолем »M. I. крепко (1 : 3,5) проявляется у потомства первого поколения иммунных родителей, и наблюдается еще и во второй генерации хотя в значительно меньшей степени. Опухолевый штамм »M. III.« вызвал только слабый иммунитет (1 : 1,5) против рака »M. I.«, а свободный от клеток фильтрат опухоли »M. I.« вызвал повышение резистентности в такой же степени (1 : 1,5) по отношению к клеткам этой опухоли. Пересадка дегтярного рака, также как и пересадка нормальных клеток, вызвала также довольно сильный иммунитет (1 : 7, или же 1 : 4) к опухолю »M. I.«. Сущностью невосприимчивости является не то, что антителы, имеющиеся в сыворотке крови повреждают клетки опухоли, — так как клетки опухоли хорошо размножаются до 5-го дня даже у иммунных животных, — но после этого срока происходит быстрая соединительнотканная инкапсуляция образовавшихся очагов опухоли, а затем раковые клетки погибают.

То обстоятельство, что авторам удалось вызвать иммунитет против пересаживаемых опухолей мышей, посредством самопроизвольных, пересаживаемых и дегтярных опухолей, легко объясняется тем, что в этих опытах вместе с опухолевыми клетками в организм попадает соответствующее количество антигенов, — по отношению к организму гомологичных и гетерологичных, — по отношению к опухолю специфических и неспецифических, — под влиянием которых возникает повышение резистентности достаточного размера. То наблюдение по которому нормальными клетками авторам также удалось вызвать иммунитет против опухоли, объясняется удовлетворительным образом только тогда, если предполагать, что резистентность к опухолям не является специфическим процессом, или же предполагая, что нормальные клетки также содержат вещество, тождественное со специфическим антигеном опухолей, или же то, что это вещество по крайней мере является очень близким антигену. Результаты опытов, согласно которым свободным от клеток фильтратом авторам также удалось вызвать повышение резистентности против опухоли, объясняется таким образом, что соответствующий антиген попал также и в свободный от клеток фильтрат. Однако, так как иммунитет к вирусам в общем не оказывается эффективным в отношении к клеткам, а невосприимчивость к клеткам не бывает эффективной к вирусам, необходимо принимать во внимание и возможность, согласно которому при образовании пересаживаемой опухоли роль играет не только размножение привитых клеток, но наряду с измененным действием нервной

системы и направленной нервной системой обмена веществ, также и фильтруемый фактор. Наконец возможно и то, что клетки пересаживаемой опухоли не могли вызвать иммунитет к дегтярному раку вследствие того, что образование дегтярной карциномы не является простым вопросом размножения клеток, а что этот вид опухолей возникает вследствие активизации дегтом фильтруемого фактора, присутствующего в латентом состоянии, путем воздействия на нервную систему и на регулируемый нервной системой обмен веществ. Предполагая же, что в тканях нормальных животных также могут присутствовать в латентном состоянии фильтруемые факторы, вызывающие опухоли, легко объясняется и тот факт, что авторам удалось нормальными клетками также вызвать иммунитет к их опухоли: в данном случае, специфический антиген, имеющийся в нормальных тканях, соответствовало бы фильтруемому агенту, присутствующему в латентном состоянии, так как согласно Зильберу и его сотрудникам специфические антигены по сути дела тождественны с нуклеопротеидами вирусов, вызывающих онухоль. Все эти предположения нуждаются еще в подтверждении, и поэтому необходимо, чтобы авторы занимались также и с патогенезом их пересаживаемой опухоли.

AETIOLOGY OF OUR TRANSPLANTABLE MOUSE TUMOURS

GY. PUTNOKY, J. KERESTÉLY, E. HOFFMANN and I. BUSTYA

INSTITUTE OF MICROBIOLOGY OF THE MEDICAL AND PHARMACEUTICAL HIGH SCHOOL, AND INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH, TARGU—MURES

(Received, September 17, 1952)

In a previous paper (1), a detailed account has been given of investigations into the immunological conditions of our transplantable mouse carcinoma strain. The views and suppositions published there required, however, to be proved and necessitated a closer study of the aetiology of our transplantable mouse tumour.

From a survey of the extremely extensive literature on the aetiology of tumours it can be established that there doubtlessly exist viruses or virus-like factors capable of producing benign and malignant tumours. These filterable agents may be classified in five groups. *(i) Rous*-type agents which are traceable in growing tumours for a long period. These agents, for being effective, do not require the presence of proliferating or regenerating tissue. The latency period of the tumours produced by them is as short as 2 to 3 weeks. *(ii)* Milk-factor type *(Bittner)* agents, with a very long latency period (8 to 10 months), their effect requiring hormone-influenced proliferating cells. *(iii) Shope*-type agents, causing benign tumours which, however, may later on turn into malignant ones. The virus can readily be detected in the benign stage of development, but no longer in the malignant tumour. According to serological examinations, in the malignant tumour the virus occurs in a latent form. *(iv) Zilber*-type agents, effective only in presence of proliferating cells, are traceable in the early stage of tumour-formation but later on no more. *(v) Kingery*-type agents, giving rise to papillomatous proliferation in the human and animal organism. The nature of the above mentioned agents is not positively determined, but the *Rous*, *Shope* and *Bittner* factors probably belong to the class of inframicrobes. In all probability, these agents by intermediary of the nervous system are capable of influencing the metabolism and the biological function of the cells in such a way that normal cells become transformed into tumour cells. The transformation being of an heritable character, the filterable agent is not necessarily playing a part in the later development of the tumour. In many tumours the filterable agent cannot be detected, it being transformed into a latent agent once the tumour-formation has started. The tumour incitant agents may live in a latent state in the organism for a long period but they

may become manifest if the metabolism of the organism undergoes a change, if they come into contact with another organism, or if they encounter proliferating cells. Cancerogenous chemical substances, by the intermediary of the nervous system, affect the metabolism and provoke proliferating and hyperplastic processes which enable the hitherto latent agents to become active. The tumour-incitant factors probably do not originate in the organism itself, but invade it from a foreign organism. According to *Pavlov*, the growth of malignant tumours and metastases exerts a reflective dystrophic action on the surrounding tissues. Has the filterable agent once elicited the appearance of a tumour on the area prepared by metabolistic changes standing under the control of the nervous system, then further growth will be maintained and regulated by the stimulating and reflective dystrophic effects produced by the tumour itself. The same effects will determine the site of the metastases as well. [*S. I. Lebedinskaya and A. A. Soloviov*, 1951. (2)]

As mentioned above, when examining the immunologic behaviour of our tumour strain »M. I.«, we had the opportunity to observe some phenomena which suggested that in the formation of this tumour strain, among others, filterable factors too might play a part. In order to elucidate this problem we had to study the aetiology of our transplantable mouse tumours.

Experimental

From tumours of our mouse carcinoma strain an emulsion was prepared with physiological saline, then centrifuged at a high speed and passed through a Chamberland or a Berkefeld filter. The cell-free filtrate was inoculated into white mice. The inoculated mice developed no tumours, yet these pre-treated animals became to a certain degree immune to the tumour. In spite of these findings we did not conclude that the tumour strain were transplantable by means of cells only. We rather believed that, although the filterable factors are present in the tumour, they are so closely connected with the tumour cells that a mere grinding in physiological salt solution does not suffice for separating them. This may be the reason why the factors are retained by the filter together with the cells and do not appear in the filtrate. Consequently a method had to be found giving means for separating the eventually filterable factor from the cells. It was thought that gradual refrigeration to a low temperature with subsequent sudden thawing would make it possible that the filterable factors separate and leave the cells. The procedure was employed first with the mouse carcinoma strain »M. I.«, later with a tumour strain obtained from transplantation of »R. II.« tumours, produced by tar products of Resica, and finally with the rat sarcoma strain »K. I.«, which had been developed by Professor *L. Haranghy* by transplanting a neoplasm originally incited by a cancero-

genous chemical substance. Pieces weighing from about 0,5 to 1 g of these tissues were refrigerated to a temperature of —24° to —25° C. Each day one piece was taken out of the refrigerator and ground in physiological salt solution. Thereafter 0,4 ml of the obtained 30 per cent cell-suspension were transplanted under the skin of white mice, while pieces of 0,30 to 0,40 g weight of the refrigerated tumour were implanted into pouches made in the subcutaneous connective tissue of white rats. Our observations were as follows.

1. Refrigerated mouse and rat tumours were transplanted into a total number of 112 white mice and white rats. From among these animals 52, or 46 per cent, developed a tumour, 11 animals, i. e. 10 per cent, succumbed before due time, while in 49 animals, i. e. 44 per cent, no tumour formation was observed. Out of the 52 tumour-bearing animals there were 23, i. e. 44 per cent, which either died or whose tumours have been further transplanted or kept as a museal specimen. For the sake of brevity, all these animals will be regarded in the following as if they had succumbed owing to tumours.

2. From among the 102 white mice into which refrigerated mouse and rat tumours had been transplanted, a tumour was found in 43, or 42 per cent; 11, or 11 per cent, died before time, and 48, or 47 per cent, showed no tumour. Out of the tumour-bearing animals 20, or 46,5 per cent, died from the neoplasm.

3. Of the 86 animals inoculated with refrigerated mouse tumours 31, or 36 per cent, developed a tumour. 11 mice, or 13 per cent, perished before due time, while 44, or 51 per cent, remained negative. Out of the 31 tumour-bearing animals 20, or 64,5 per cent, died from the tumour.

4. Refrigerated rat tumours had been heterotransplanted into 16 mice. Tumours were formed in 12 animals, or 75 per cent, while no growth was obtained in 4, or 25 per cent. The tumour later on regressed in all the 12 animals.

5. Finally, refrigerated rat tumours had been transplanted into 10 white rats, out of which 9 yielded a positive result and 3 died from the tumour.

Summing up the results of these experiments, transplantation of tumours which had been refrigerated to a temperature of —24° to —25° C for a period of 1 to 5 days gave rise to neoplastic growth in 36 to 75 per cent of the inoculated animals, of which 30 to 64 per cent died from the tumour. The frequency of tumour formation was from 47 to 50 per cent with tumours previously refrigerated for a period of 24 to 96 hours. A lower percentage of tumour formation, precisely 12 per cent, was observed only in the case when refrigeration had lasted for 120 hours. Out of the 23 animals that had become definitely tumour-bearing, 16 succumbed to the tumour, 3 were kept as museal preparations, and the tumours of 4 animals were further transplanted. Each of the 4 new host animals showed a positive tumour growth.

It is not easy to interpret the results of these experiments. The most simple explanation would be that the tumour cells were able to stand refrigeration to —24° to —25° C for 1 to 5 days, without being greatly damaged, and the

neoplasms obtained originated from surviving tumour cells. Exact data on the resistance to cold of animal cells could not be found in the literature. Professor *M. Gündische* obligingly placed some literary data at our disposal and we take the opportunity to express our gratitude for his assistance. According to these data, chick-embryo cells remain viable from 5 minutes to 3 hours at a temperature of —24° to —25° C; for 33 hours at —15°C; and from 2 to 37 hours at —10° C. Endocrine glandular tissues preserved by regular deep-freezing are capable of keeping their viability for several days. *(E. Kubányi.)* Furthermore it is an established fact that tumour cells, similarly to embryonal ones, are more resistant to refrigeration than normal cells. This is especially true if refrigeration occurs suddenly, in which case only tiny ice crystals, hardly damaging the cells, are formed, and if subsequent defrosting is carried out carefully. In our experiments the tumour particles were refrigerated very slowly, in the course of several (6 to 8) hours, and thawing was performed rapidly, within a few minutes, in order to ensure opening of the cells. Among the tumour strains the cancer strain »M. I.« was of a minor virulence, causing tumour formation in only 66 per cent of the animals. Thus it is unlikely that the rough trauma of slow refrigeration with subsequent sudden defrosting would decrease with only 20 per cent the tumour producing capacity of these not very virulent cells. We rather believe that the tumours arising after transplantation of the refrigerated tissue originated not so much from surviving cells but from some highly frost-resistant factors liberated from them. As to the nature of these factors, we are not in a position to give particulars at this moment.

In the course of our refrigeration experiments the interference of surviving cells, cell particles, or eventual cell components, could not be excluded. In further experiments the tumour-bearing substance, refrigerated for 1 to 5 days to —24° to —25° C, was subsequently suspended in physiological saline and after preliminary centrifuging the suspension was filtered through a Chamberland L_5 or a Seitz filter. 0,5 to 1,0 ml of this cell-free filtrate was then subcutaneously inoculated into white mice and white rats. The experiments yielded the following results.

6. Cell-free filtrates of mouse and rat tumours were inoculated into a total number of 149 animals. Out of these 22, or 15 per cent, gave a positive result, 20, or 13 per cent, perished before due time, while in 107 no tumour formation was observed. Half of the 22 tumour-bearing animals, i. e. 11, either died from the tumour, or their tumours were further transplanted, or eventually preserved.

7. Out of the 139 animals inoculated with mouse and rat tumours, neoplastic growth occurred in 17, or 12,5 per cent; 20 animals, or 14 per cent, perished before due time, while in 102 no tumour formation was observed;

11, or 65 per cent, out of the 17 tumour-bearing animals succumbed to the tumour.

8. Out of the 23 mice which had been inoculated with the cell-free filtrate of mouse tumour, 14, or 12 per cent, showed tumour-growth, 15, or 12 per cent, perished before due time, while 94 animals, or 76 per cent, remained negative. 8 out of the 14 tumour-positive animals died from the tumour.

9. A cell-free rat tumour filtrate had been inoculated into 16 mice. A positive result was obtained in 3 cases, 5 animals perished before due time, while 8 remained negative. Each of the tumour-positive animals died from the tumour.

10. Finally, the cell-free filtrate of rat tumour was inoculated into 10 rats. Tumour growths were observed in 5 cases, but later on all tumours regressed.

Thus we succeeded in producing tumours in mice with the cell-free filtrates of a transplantable mouse carcinoma and of a transplantable mouse sarcoma, and in producing tumours in mice and rats with the filtrate of a transplantable rat sarcoma. Neoplasm formation occurred in 12 to 18 per cent of the inoculated animals. The tumours of 50 to 65 per cent of the tumour-positive animals have been either further transplanted or preserved as museal specimens. Out of 6 transplanted mouse tumours 4 proved to be further transplantable ; in one experiment all the inoculated animals perished before due time, and the tumour of 1 animal proved to be completely necrosed when transplantation was attempted. 5 tumour-bearing animals were preserved. It is remarkable that the frequency of positive takes was roughly proportional to the duration of refrigeration. Filtrates of substances refrigerated for 24 hours did not yield positive results ; those refrigerated for 48 hours produced tumour-formation in 5 per cent, those refrigerated for 72 hours in 22 to 25 per cent, and those refrigerated for 90 hours in 13 to 15 per cent.

Discussion

To explain the results obtained is by no means an easy task. The first question to be decided is whether the obtained growths are in fact tumours and not only inflammatory, eventually granulating or regenerating processes. The growths reached imposing sizes in the mice as demonstrated by the specimens preserved. Nearly all the growths obtained were transplantable in the same way as the primary tumour. Finally, histological examinations carried out in the Institute of Pathological Anatomy, revealed the structures as medullar cancer, rotundocellular carcinoma or polymorphocellular sarcoma, so that the growths produced with the filtrate decidedly proved to be malignant tumours.

We must not fail to consider, whether or not spontaneous animal tumours may have interfered with the experiments. The following facts make this

supposition most improbable. *(i)* A tumour frequency of 12 to 18 per cent is not likely to occur in a mingled stock, originating from several breeds, as were employed by us ; *(ii)* all the tumours obtained except one appeared on the site where the filtrate had been inoculated ; *(iii)* spontaneous tumours have usually a more or less differentiated histological structure, while the histological structure of all tumours produced with the filtrate was highly undifferentiated. Finally, *(iv)* the histological picture of the tumours obtained was identical with that of the primary tumour. Thus the neoplasms observed appear to have been products of the filtrates inoculated and not spontaneous tumours.

Another point not to be neglected was an eventual deficiency of the filters, owing to which cells might have remained in the filtrate. The filters were repeatedly checked in respect to their intact condition and were always found to retain the most minute ones of bacteria kept in our collection, such as Serratia marcescens or Brucella abortus, so that the filters had to be considered reliable.

Consequently, the tumours examined by us seemed to be transplantable by means of their cell-free filtrate. It is true that only a relatively small part, 12 to 18 per cent, of the inoculated animals showed positive results. This may have been due to various causes. The cell-free filtrate may have affected the nervous system, and, by its mediation, the metabolism, only in a small number of the animals, i. e. in those which were adequately susceptible, while the majority offered sufficient resistance to tumour formation. Or, the filterable factor, entirely separated from the cell, might be seldom able to exert its action and to penetrate into new cells in the new host. It is also possible that the pathogenic effect of the filterable agent decreases parallel with the development of the tumour, and since we have worked constantly with filtrates of relatively aged and extensive tumours, the agents present in the filtrate may have possessed a weak pathogenic effect. In any case, a very long latency period and a tendency for regression was characteristic of the tumours produced by filtrates. It seems most probable that by employing filtrates of younger tumours, by appropriately supporting the life conditions of the agents present in the filtrate, and by weakening the resistance of the inoculated animals, we might have obtained considerably better transplantation results.

We are not in a position to specify the factors responsible for the general and local affection of the animals. What must be taken into consideration are metabolism products within the tumours, growth-promoting substances, enzymes and also virus-like substances. It is not known whether some of the above mentioned factors are or are not capable of producing, after a comparatively short period, malignant tumours, which are transplantable, rapidly growing and finally destroying the animals, as it is the case with viruses or virus-like materials. All that can be said at present is that in the tumours examined

we were able to trace substances which had passed filters retaining bacteria and had been capable of producing true malignant tumours in a certain number of animals.

There is yet another question which deserves attention, viz. whether the process observed is a merely accidental phenomenon or may be regarded as a general rule. The fact that in one case a spontaneous mouse tumour, in a second case an experimental mouse tumour produced by tar, and in a third case an experimental rat tumour produced by a cancerogenous chemical substance could be transplanted, and each of the secondary tumours obtained proved to be again transplantable with a cell-free filtrate, suggests the conclusion that, at least as regards transplantable animal tumours, a rule of general validity may have been involved.

Summary

Three tumour strains were examined: (i) a mouse carcinoma strain marked »M. I.«, obtained by transplantation of spontaneous tumours; (ii) a transplantable mouse sarcoma strain marked »R. I.«, obtained by transplantation of tumours produced by tar and (iii) a transplantable rat sarcoma strain marked »K. I.«, obtained by transplantation of tumours produced by cancerogenous chemical substances.

The tumours of all the three strains had been refrigerated for a period of 1 to 5 days at a temperature of —24° to —25° C, then rapidly thawed and inoculated into animals. 30 to 75 per cent of the animals inoculated developed a neoplasm and 30 to 64 per cent of the tumour-affected animals died from the tumour. The frequency of »takes« of tumours refrigerated for 24 to 96 hours was 50 to 47 per cent and only the tumours refrigerated for 120 hours showed an essentially lower frequency of »takes«, amounting to 12 per cent. Out of the 23 animals that became definitely tumour-bearing, 16 died from the tumour, 3 animals were preserved as specimens, and the tumours of 4 animals were further transplanted. Each of the transplanted 4 tumours lead to a positive result in the new host animal. On basis of the experiments it seems most improbable that tumours originating after transplantation of a very slowly refrigerated but suddenly thawed tumour tissue, would have developed from surviving tumour cells. There must exist some other factors, liberated from the cells and extremely frost-resistant, which are playing a role in this process.

By means of cell-free filtrates of the transplantable mouse carcinoma »M. I.« and of the transplantable mouse sarcoma »R. I.«, it was possible to produce tumourous growths in mice, and with the cell-free filtrate of the transplantable rat sarcoma »K. I.« to produce tumours in both mice and rats. 12 to 18 per cent of the animals inoculated with the cell-free filtrate developed neo-

plasms, and 50 to 65 per cent of the tumours of the positive animals were further transplanted or preserved as museal specimens. Out of the transplanted 6 mouse tumours, 4 proved to be further transplantable. It is most remarkable that the frequency of positive takes was almost in a direct ratio to the duration of refrigeration. The histological structure of the tumours produced by the effect of cell-free filtrates was similar to that of the primary tumours. The authors have convinced themselves about the reliability of the filters employed, and the occurrence of spontaneous tumours did neither interfere with the experiments.

On the basis of the experiments, it is presumed that in the three transplantable animal tumours examined such substances could be traced which, passing through the filter, were able to produce malignant tumours in a minor number of animals. It is concluded, at least as regards transplantable animal tumours, that this statement may be considered as a rule of general validity.

LITERATURE

1. *Putnoky, Gy., Kerestély, J., Gyergyay, F.* and *Bustya, I.*: Acta Physiol. Hung. **4**, 411 (1953)
2. *Lebedinskaya, S. I.* and *Soloviov, A. A.*: Das Deutsche Gesundheitswesen **50**, 1464 (1951)

ПАТОГЕНЕЗ ПЕРЕСАЖИВАЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ МЫШЕЙ

Д. Путноки, Я. Керештель, Е. Гоффманн и И. Буштя

Микробиологический кафедр медицинского и фармакологического института высшего образования и Институт здравоохранения, Таргу-Муреш

Резюме

Авторы замораживали на температуре в минус 24—25° С в течение 1—5 дней опухоли пересаживаемого штамма рака мышей со знаком »М. I.« полученного при помощи трансплантации спонтанной опухоли, пересаживаемого штамма саркомы мышей, полученный путем трансплантации опухоли, вызванной дегтем, и пересаживаемого штамма саркомы крыс со знаком »К. I.« полученный трансплантацией опухоли, вызванной канцерогенным химическим веществом. Привитые с этими оттаенными опухолями животные дали в 36—75% новообразования, а 30—64% заболевших животных погибли вследствие возникших опухолей. Частота положительных пересадок опухолей, замороженных в течение 24—96 часов, было 50—47%, а значительно более низкую: 12%-ную частоту положительности проявляли лишь опухоли, замороженные в продолжении 120 часов. Из 23 животных, окончательно заболевших опухолями, 16 погибли вследствие тумора, опухоли 4 животных авторы пересаживали дальше, а из трех животных они изготовили выставочные музеальные препараты. Пересаженные 4 опухоли зачинались и у новых хозяев. Авторы на основании их опытов не считают вероятным, что после пересаживания очень медленно замороженной, но внезапно оттаенной опухолевой ткани, опухоли вызываются переживающими клетками тумора. Они предполагают, что здесь роль играют факторы, освободившиеся из клеток, и являющиеся весьма устойчивыми по отношению холода.

Со свободными от клеток фильтратами вышеупомянутого пересаживаемого рака мышей и пересаживаемой саркомы крыс, авторам удалось вызвать у мышей со свободным от клеток фильтратом вышеприведенной саркомы крыс как у мышей, так и у крыс образование опухолей. У 12—18% животных, привитых с бесклеточном фильтратом, образовались новообразования; 50—65% опухолей заболевших животных авторы

пересаживали дальше, или же изготовили из них выставочные препараты. Из перевитых 6 туморов мышей 4 оказались годными к дальнейшему пересадку. Интересным является то, что частота положительных пересадок оказалась почти пропорциональной с длительностью времени замораживания. Патологистологическая структура опухолей, образовавшихся под действием свободных от клеток фильтратов, совпадала структурой исходных опухолей. Авторы убеждены в том, что их фильтры были интактными, далее и в том, что появление самопроизвольных опухолей не мешало их экспериментам. На основании опытов они предполагают, что исследованные или пересаживанные три вида опухолей животных содержали вещества, которые проникнули через фильтр задерживающий бактерий, и могли таким образом у небольшой части животных вызвать образование злокачественных опухолей. Авторы считают, что это установление является общедействительным правилом, по крайней мере в отношении пересаживаемых опухолей животных.

WERTBESTIMMUNG DES AUREOMYCINS MIT DER AGARDIFFUSIONSMETHODE

Von

I. HORVÁTH und G. WIX

FORSCHUNGSINSTITUT FÜR DIE PHARMAZEUTISCHE INDUSTRIE, BUDAPEST

(Eingegangen: am 3. Januar 1953)

Das geeignetste Verfahren zur Durchführung einer grossen Zahl von Antibiotikumbestimmungen ist die Agardiffusionsmethode. *Price* und Mitarbeiter (2) berichten, dass sie zahlreiche Mikroorganismen mit dem Ziele untersucht haben, einen geeigneten für die Wertbestimmung des Aureomycins mit dieser Methode zu finden. Bei ihren Versuchen erhielten sie das beste Resultat mit dem Bacillus subtilis (Stamm PCI-219), doch gelang es ihnen selbst mit diesem Mikroorganismus nicht, Hemmungsringe ohne verschwommene Ränder und von gleichbleibender Form zu bekommen. Auf Grund dieser Arbeit wurde dann die Diffusionsmethode als ungeeignet für die Bestimmung von Aureomycin angesehen. Im Jahre 1949 beschrieben *Randall* und Mitarbeiter (3) eine erfolgreiche Agardiffusionsmethode. Bei Verwendung des Stammes Sarcina lutea (PCI-1001) führten sie die Bestimmungen auf einem Agarnährboden durch, der Pepton, hydrolysiertes Kasein, Hefeextrakt, Rinderherzextrakt und Glukose enthielt. Das Aureomycin wurde in eine 1%ige saure Kaliumphtalat-Borsäure-Pufferlösung eingewogen, wonach die antibiotische Aktivität zwischen den Aureomycinkonzentrationen von 4 γ/ml und 29 γ/ml mit ihrer Methode gemessen werden konnte.

Im nachstehenden soll eine Methode beschrieben werden, bei der das Aureomycin mit Hilfe von Bacillus subtilis (Stamm ATCC-6633) bestimmt werden kann. Dieser Mikroorganismus ist zwar für Bestimmungen auf üblichen Nährböden ungeeignet, doch kann die Bestimmung dennoch durchgeführt werden, wenn man dem Nährboden Mangan- und Kupfersalz beimischt.

Experimenteller Teil

Die Herstellung der Agarplatten sowie die Verdünnung der zur Überimpfung verwendeten Mikroorganismen stimmte mit den Vorschriften der "*Food and Drug Administration*" der Vereinigten Staaten für die Penicillinbestimmung überein. Der pH-Wert der verwendeten Agarplatten wurde vor der Sterilisation auf 6,5 eingestellt. Die Aureomycinsubstanz wurde in einer 0,15 *M*

Phosphatpufferlösung (pH 6,2) gelöst und die Verdünnung mit dieser Pufferlösung vorgenommen. 200 γ /ml Stammlösung wurde auf +4°C gehalten und 3 Tage hindurch benutzt. Die Platten wurden 2 Stunden bei 37°C vorinkubiert, dann mit einem Locher von 8 mm ∅ durchlöchert, das zu untersuchende Material in 0,1 ml pipettiert und eine Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden dann die Durchmesser der entstandenen Hemmungsringe gemessen.

Die zu untersuchenden Ionen wurden in sterilem Zustand dem geschmolzenen, bereits sterilen Agar unmittelbar vor dem Giessen der Platte aus einer Stammlösung zugegeben, die 40 mg $CuSO_47H_2O$ und 20 mg $MnSO_42H_2O$ pro ml enthielt. Die Wirkung der Ionen wird auf den von den Hemmungsringen gemachten Aufnahmen gezeigt. Der Durchmesser des Loches betrug auf den Agarplatten immer 8 mm. In Kenntnis dieser Angaben lässt sich die Grösse des erhaltenen Hemmungsringes leicht aus den Lichtbildern feststellen. In jedes Loch wurde stets 0,1 γ/ml Aureomycinlösung pro 0,1 ml pipettiert.

Abb. 1/a. Aufnahme eines Hemmungsringes, dem keinerlei Ionen zugegeben wurden. Aus dem Bild ist gut ersichtlich, dass der Hemmungsring nicht scharf, sondern verschwommen ist.

Abb. 1/b, c, d. Wirkung von 2,4 und 8 mg/100 ml $CuSO_47H_2O$. Die Schärfe des Hemmungsringes hat sich im Vergleich zur Kontrollaufnahme nicht wesentlich verändert. Demgegenüber ist die Hemmungszone infolge der 8 mg/100 ml $CuSO_47H_2O$ grösser geworden.

Abb. 1/e. Wirkung von 16 mg/100 ml $CuSO_47H_2O$. Der Rand des Hemmungsringes ist scharf geworden und kann jetzt gut gemessen werden. Im Vergleich zur Wirkung von 8 mg/100 ml $CuSO_47H_2O$ ist nun der Durchmesser des Hemmungsringes grösser.

Nach der Wirkung des Kupfersulfats wurde die von $MnSO_42H_2O$ untersucht. Hierzu wurden Konzentrationen von 4, 10, 25 bzw. 50 mg/100 ml verwendet. Als Wirkung von $MnSO_4$ ergaben sich doppelte Hemmungsringe. Bei den höheren Konzentrationen wurde das Flächenwachstum der Mikroorganismen durch das $MnSO_4$ ausgesprochen gesteigert, wobei manchmal sogar innerhalb des Hemmungsringes eine schwache Zunahme festgestellt werden konnte. Auf den Aufnahmen gelang es nicht, ein charakteristisches Bild der doppelten Hemmungsringe festzuhalten, die Aufnahmen zeigten auch hier einen verschwommenen Rand. Aus diesem Grunde werden diese Aufnahmen hier nicht veröffentlicht.

Danach wurde die kombinierte Wirkung des Kupfer- und Mangansulfats untersucht. Das optimale Ergebnis wurde bei einer Mischung von 10 mg $MnSO_4$ und 16 mg $CuSO_4$ erhalten *(Abb. 1/f)*. Hier ergab sich ein scharfrandiger, gut messbarer Hemmungsring, der auch bei Routinebestimmungen leicht verwendet werden konnte.

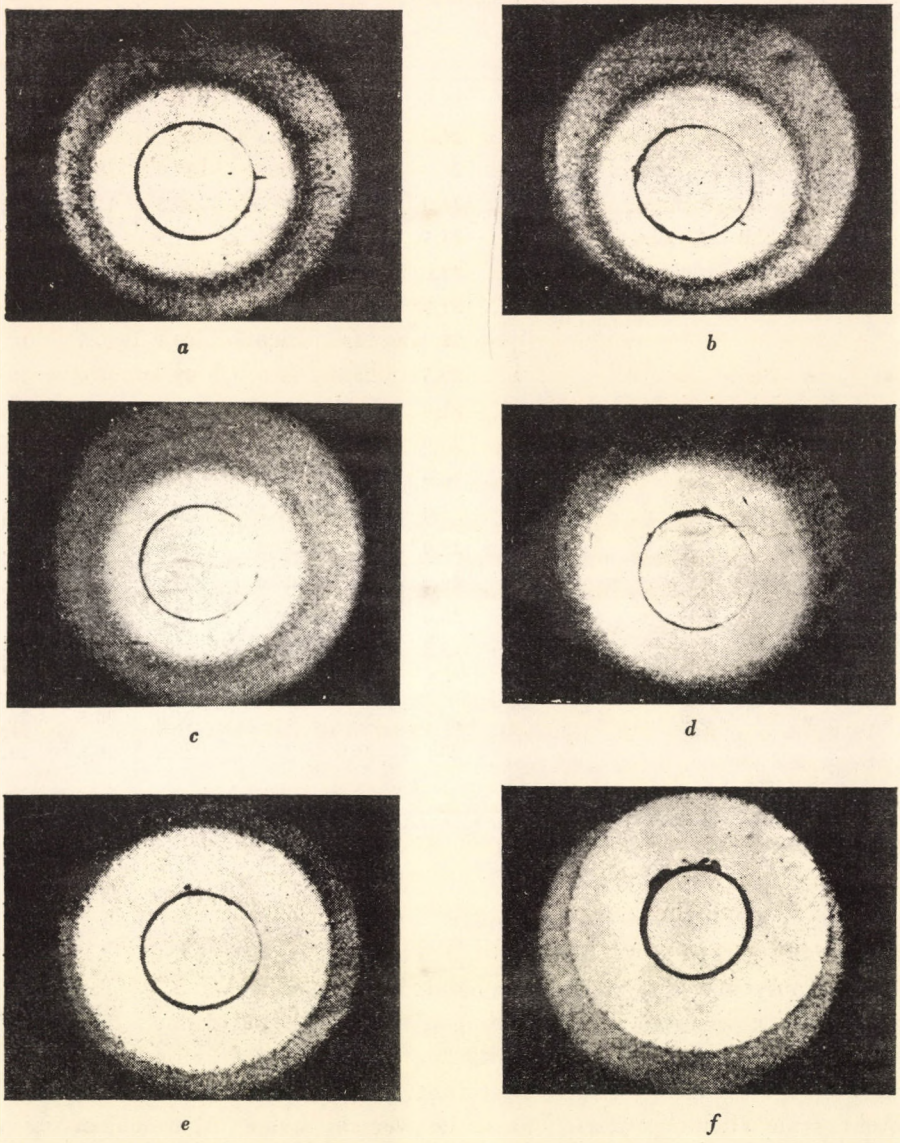


Abb. 1. Wirkung von Kupfer- und Manganionen auf die Hemmungszone des Aureomycins

TABELLE I

Wirkung von Kupfersulfat und Mangansulfat auf die Grösse der Hemmungszonen

Menge der zugegebenen Metallionen mg/100 ml Agar	Konzentration der zugegebenen Aureomycinlösung					
	0,2 E		0,15 E		0,1 E/ml Aureomycin	
	Durchmesser des Hemmungsringes in mm					
$CuSO_4$ 7 H_2O 4,0	15,5	16,0	15,0	15,0	13,0	12,0
« «	16,0	16,0	14,5	15,0	14,0	13,0
« « 8,0	21,0	20,0	19,0	19,0	18,0	17,0
	20,0	19,5	19,5	18,5	16,0	17,0
« « 12,0	23,5	23,0	21,5	21,5	19,0	19,5
	23,0	24,0	22,5	22,0	19,5	20,0
« « 16,0	21,0	21,0	19,5	20,0	18,0	18,0
	22,0	21,0	20,0	20,5	19,0	19,0
« « 20,0	20,5	20,5	20,0	19,5	18,0	19,0
	21,0	21,5	20,0	20,0	18,5	19,0
« « 4,0 +$MnSO_4$ 2 H_2O 10	16,0	16,0	14,5	14,0	13,0	12,0
	16,0	15,0	14,0	14,0	13,0	12,0
« « 8,0 + «	23,0	23,5	22,5	22,0	19,0	20,0
	23,0	23,0	22,0	21,5	20,0	20,0
« « 10,0 + «	26,0	25,5	24,0	24,0	22,5	23,5
	25,0	25,5	24,0	24,0	22,0	22,0
« « 16,0 + «	22,5	22,0	21,0	21,5	20,0	20,0
	22,5	23,0	21,5	22,0	20,5	20,5
« « 20,0 + «	22,5	22,5	21,5	21,5	20,5	20,0
	23,5	24,0	22,5	22,5	20,5	21,0

Anmerkung : Die in derselben Reihe stehenden Werte sind die Durchmesser der in einer Petrischale gemessenen 6 Hemmungsringe.

Durch Beimischung von Kupfer- und Manganionen in entsprechender Konzentration wurde also ermöglicht, den Bacillus subtilis bei der Bestimmung des Aureomycins als wertbestimmenden Mikroorganismus heranzuziehen. Im Laufe der weiteren Untersuchungen stellte es sich jedoch heraus, dass die optimale Kupfer- und Mangankonzentration für jede einzelne auf einmal gekochte Agarmenge gesondert bestimmt werden musste. Der Grund hierfür besteht wahrscheinlich darin, dass die verschiedenen Agarmengen in verschiedener Quantität Spurenelemente bzw. Stoffe enthalten, welche die Ionen in Komplexe überführen und so deren Wirkung abschwächen. Bei Routinearbeiten ist deshalb an jeder Agarmenge die Wirkung von 2—20 mg/100 ml Agar $CuSO_4 7H_2O$ sowie von 4—50 mg/100 ml Agar $MnSO_4 2H_2O$ auf die Grösse der Ringe und die Schärfe ihrer Ränder zu untersuchen. Wenn nun die opti-

nalen Konzentrationen für beide Metalle gesondert bekannt sind, so werden lie drei am besten erscheinenden Konzentrationen des einen Metalls mit jeder ler drei besten Konzentrationen des anderen Metalls ausprobiert, worauf lann die zusammen als beste befundenen Konzentrationen solange bei den Bestimmungen verwendet werden, als noch Agar von der betreffenden Menge vorhanden ist. Bei jeder neuen Menge wird auf diese Weise verfahren. In den durchgeführten Versuchen erwies sich eine $CuSO_4$-Konzentration zwischen

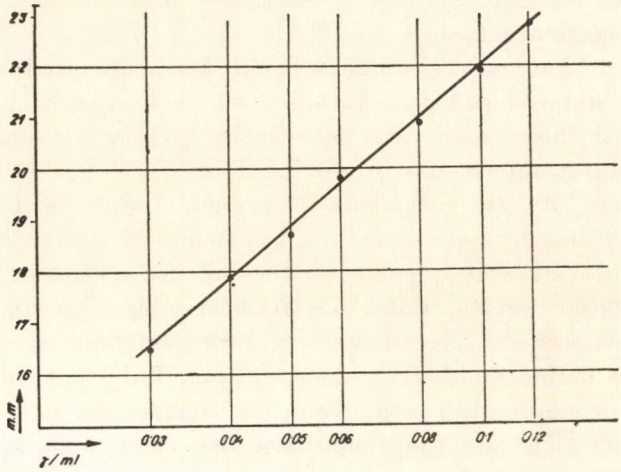


Abb. 2. Titrierungskurve von Aureomycin. Abszisse: Logarithmus der Aureomycinkonzentration. Ordinate: Durchmesser des erhaltenen Hemmungsringes

12 mg und 20 mg sowie eine $MnSO_4$-Konzentration zwischen 8 mg und 10 mg als optimal.

In Kenntnis der obigen Angaben wurde die Standardkurve des Aureomycins zwischen 0,03 und 0,12 aufgetragen, so wie dies von *Randall* und Mitarbeitern (3) beschrieben wurde.

Auf *Abb. 2* wird der Ablauf einer solchen Standardkurve gezeigt. Mit der beschriebenen Methode können innerhalb der üblichen Fehlergrenze der Agardiffusionsmethode Aureomycinbestimmungen durchgeführt werden. Falls eine solche Bestimmung in 3 Petrischalen vorgenommen wird, so beträgt der maximale Fehler $\pm$ 10%.

Diskussion

Die Wertbestimmungsmethoden für Antibiotika wurden bisher in der Weise ausgearbeitet, dass man einen entsprechenden Stamm suchte, der dem zu prüfenden Antibiotikum gegenüber empfindlich war; darauf erhielt man bei Verwendung der in üblicher Weise hergestellten Nährböden auf der Agar-

platte infolge der Wirkung des Antibiotikums einen scharf abgegrenzten Hemmungsring. Natürlich wurde bei der Wahl der Zusammensetzung des Nährbodens auf die Ansprüche des Mikroorganismus Bedacht genommen und auch die optimale Diffusionsfähigkeit des Antibiotikums im Nährboden berücksichtigt. Diese konnte durch Veränderungen des pH, eventuell durch Veränderungen der Salzkonzentration, durch Beigabe von oberflächenspannungsvermindernden Substanzen gesteigert werden.

In unserem Institute wurde von *Bodánszky*, *Horváth* und *Lovrekovich* (1) die Beobachtung gemacht, dass das Wachstum des Bacillus subtilis (Stamm ATCC-6633) auf den zur Wertbestimmung des Antibiotikums dienenden Platten unter unterschiedlichen Verhältnissen von verschiedenen Schwermetallionen beeinflusst wird. Das Manganion steigert vor allem das Oberflächenwachstum, während das Kupferion das Wachstum im Inneren der Agarplatte erhöht. Es war anzunehmen, dass mit Steigerung des Wachstums des Mikroorganismus in erster Linie die hemmende Wirkung der Antibiotika sich erhöhen und stärker ausprägen wird. Dies konnte in den hier beschriebenen Versuchen bestätigt werden, wobei das Schärferwerden des Ringes nach der Ansicht der Verfasser auf folgende Ursache zurückzuführen ist : in einer Bakteriensuspension befinden sich Individuen, die zum Teil den Antibiotika gegenüber verschieden empfindlich sind. Wenn die Hemmungszone verschwommen ist, dann ändert sich die Empfindlichkeit des Bakteriums gegenüber dem Antibiotikum in verhältnismässig weiteren Grenzen. Durch die Gegenwart von Kupfer- und Manganionen wird diese Empfindlichkeitsgrenze enger gezogen, wodurch schärfere Hemmungsringe zustande kommen.

Zusammenfassung

1. Es wird eine Agardiffusionsmethode beschrieben, die es ermöglicht, Aureomycin mit Bacillus subtilis (Stamm ATCC-6633) routinemässig zu bestimmen.

2. Die Möglichkeiten der Agardiffusions-Wertbestimmungen von Antibiotika wurden durch eine neue Lösung erweitert : zur Bestimmung ungeeignete, doch gegenüber Antibiotika empfindliche Mikroorganismen werden zur Bestimmung geeignet, wenn man durch dem Nährboden zugegebenen Metallionen ihr Wachstum und parallel damit ihre Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika beeinflusst.

LITERATUR

1. *Bodánszky, M., Horváth, I., Lovrekovich, I.* : Unveröffentlichte Angaben.
2. *Price, C. W., Randall, W. A., Welch, H.* : Ann. N. Y. Acad. Sci. **51**, 211 (1948).
3. *Randall, W. A., Kirschbaum, A., Nielsen, J. K., Wintermere, D.* : J. Clin. Investigation **28**, 940 (1949).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АУРЕОМИЦИНА АГАР-ДИФФУЗИОННЫМ СПОСОБОМ

И. Хорват и Д. Викс

Фармакологический исследовательский институт, Будапешт

Резюме

1. Авторами описан агар-диффузионный способ, при помощи которого штаммом bacillus subtilis ATCC-6633 возможно рутинное определение ауреомицина.

2. Возможности определения действия антибиотика агаровой диффузии расширены авторами новым способом: непригодные для определения, но чувствительные по отношению антибиотика микроорганизмы становятся вполне пригодными для определения, если воздействовать на их рост и параллельно с этим на их чувствительность по отношению антибиотиков подмешанными в питательную среду ионами металлов.

A kiadásért felel: Mestyán János Műszaki felelős: Farkas Sándor
Kézirat beérkezett: 1953. III. 31. — Terjedelem: 19 (A/5) ív + 1 melléklet, 69 ábra

Akadémiai nyomda, Gerlóczy-u. 2. — 23967/53 — Felelős vezető: ifj. Puskás Ferenc

INDEX

BIOCHEMIA

J. Domonkos und *I. Huszák :* Über die Katalaseaktivität von Histamin- und Antihistamin-Häminkomplexen — Я. Домонкош и И. Хусак: О каталазном действии комплексов гистамина- и антигистамина-гемина 225

St. Szára und *D. Bagdy :* Über die Polysaccharide des Fibrinogens und Fibrins — И. Сара и Д. Багди: О полисахариде фибриногена и фибрина 229

F. B. Straub : Über die Akkumulation der Kaliumionen durch menschliche Blutkörperchen — Ф. Б. Штрауб: Накопление К в человеческих эритроцитах 235

PHYSIOLOGIA

E. Grastyán, K. Lissák, T. Hasznos and *L. Molnár :* Some functional properties of hypothalamic inhibition — Е. Граштян, К. Лишшак, Т. Хаснош, Л. Мольнар: Особенности гипоталамического торможения 241

E. Grastyán, K. Lissák, T. Hasznos : Analysis of hypothalamic reaction reversal — Е. Граштян, К. Лишшак, Т. Хаснош: Условия обратимости реакции гипоталамуса 253

E. Grastyán, K. Lissák and *L. Molnár :* The functional relation between gyrus cinguli and caudate nucleus in the cat — Е. Граштян, К. Лишшак, Л. Мольнар: Функциональная связь между поясной извилиной и хвостатым ядром у кошек 261

E. Endrőczi and *K. Lissák :* Role of the central nervous system in the regulation of the pituitary-adrenocortical system — Е. Эндрэци и К. Лишшак: Исследования нервно-эндокринных корреляций. Роль центральной нервной системы в регуляции деятельности системы гипофиз — кора надпочечника 271

E. Endrőczi and *A. Tigyi :* The effect of steroid-compounds on the neuromuscular system. I. Effects in vitro on the striated muscle of the frog — Е. Эндрэци и А. Тидьи: Влияние соединений со стероидной структурой на нервную и мышечную деятельность. I. Действие in vitro на поперечнополосатую мускулатуру лягушек 287

Sz. Donhoffer, Gy. Mestyán, E. Obrincsák-Pap, T. Pap and *I. Tóth :* The thermoregulatory significance of the increase in O_2-consumption elicited by high environmental temperature — С. Донгоффер, Д. Мештян, Е. Обринчак, Т. Пап и И. Тот: Роль повышения потребления O_2, возникающего при высокой внешней температуре, на теплорегуляцию 291

Zs. Gáspár-Németh und *B. Issekutz jun. :* Beiträge zum Wirkungsmechanismus des Azulenols — Ж. Гашпар-Немет и Б. Ишшекуц: О механизме действия азуленола .. 301

P. Weisz, E. Gláz, P. Kertai, K. Weisz, Sz. Vasenszky und *T. Gáti :* Ausbildung des bedingten Reflexes in Verbindung mit der Funktion der Nebennierenrinde — П. Вейс, Э. Глаз, П. Кертаи, К. Вейс, С. Вашенский и Т. Гатм: Выработка условных рефлексов на функцию коры надпочечника 307

M. Händel, P. Kertai, J. Sós, K. Weisz und *I. Balkányi :* Beeinflussung der experimentellen neurogenen Hypertonie durch Medikation und Diät bei Ratten — М. Гендель, П. Кертаи, Й. Шош, К. Вейс и И. Балканьи: Влияние лекарств и режима питания на экспериментальную нервогенную гипертонию у крыс 315

PHARMACOLOGIA

L. Gyermek : Beiträge zur Pharmakologie vom Tryptamin, Tyramin und Phenylaethylamin — Л. Дьермек: Данные к фармакологии триптамина, тирамина и фенилэтиламина 323

L. Gyermek : Studies on cholinergic blocking substances IV. Correlation between structure and effect of quaternary derivatives of benzoyltropine and benzoyl ψ tropine compounds — Л. Дьермек : Исследование веществ, парализирующих холинергическую систему. IV. Связь между химическим строением и действием у четвертичных производных соединений бензол-тропин и бензоил ψ тропин 333

L. Gyermek and *K. Nádor :* Studies on cholinergic blocking substances V. The pharmacology of monoquaternary tropeines acting on vegetative ganglia — Л. Дьермек и К. Надор : Исследование веществ парализирующих холинергическую систему. V. Фармакология моночетвертичных тропеинов, действующих на вегетативные ганглии 341

F. Herr, L. György, J. Pórszász und *J. Bonta :* Untersuchungen über die Wirkung gefässerweiternder Mittel bei experimenteller renaler Hypertonie von Ratten — Ф Херр, Л. Дьердь, Я. Порсас и Й. Бонта : Исследование сосудорасширяющих веществ у крыс при экспериментальной ренальной гипертонии 355

F. Herr, J. Borsi, Gy. Pataky : Wirkung der Umwelttemperatur auf die Toxizität der Analgetika — Ф. Херр, Я. Борши, Д. Патаки : Влияние окружающей температуры на токсичность болеутоляющих средств 363

E. Komlós, I. Knoll, L. Tardos, V. Szász : Neue Methode zur Messung der lokomotorischen Reaktion von Versuchstieren (Untersuchungen mit Aktedron) — Э. Комлош, И. Кнолл, Л. Тардош и В. Сас : Новый способ измерения локомоторной реакции подопытных животных (исследования актедроном) 373

MICROBIOLOGIA

G. Ivánovics, A. Koch und *E. Cserey-Pechány :* Untersuchung mit dem Virus der Aujeszkyschen Krankheit — Дь. Иванович, А. Кох и Э. Череи-Пехань : Исследования по вирусу Ауески 383

G. Ivánovics and *St. Horváth :* On the chemical structure of the capsule of B. anthracis and B. megatherium — Дь. Иванович и И. Хорват : Химическая структура капсулы b. antracis и b. megatherium 401

Gy. Putnoky, J. Kerestély, F. Gyergyay and *I. Bustya :* Immunological conditions of our transplantable mouse carcinoma strain — Дь. Путноки, Я. Керештель, Ф. Дьердяи и И. Буштя : Иммунитет по отношению к пересаживаемому штамму рака мышей 409

Gy. Putnoky, J. Kerestély, E. Hoffmann and *I. Bustya :* Aetiology of our transplantable mouse tumours — Дь. Путноки, Я. Керештель, Э. Гоффманн и И. Буштя : Патогенез пересаживаемых опухолей мышей 425

I. Horváth und *G. Wix :* Wertbestimmung des Aureomycins mit der Agardiffusionsmethode — И. Хорват и Дь. Викс : Определение Ауреомицина агар-диффузионным способом 435

Les *Acta Physiologica* paraissent en russe, français, anglais et allemand 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 et écrits à la machine 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 ($ 6.50) par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise du Commerce Extérieur des Livres et Journaux »Kultúra« (Budapest VI., Sztálin-út 21. Compte-courant No. 45-790-057-50-032) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

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

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

Manuscripts should be typed and 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. — forint (S 6.50) a volume. Orders may be placed with »Kultúra« Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest VI., Sztálin-út 21. Account No. 45-790-057-50-032) or with representatives abroad.

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

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

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind, mit Maschine geschrieben, 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 ($ 6.50). Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Außenhandels-Unternehmen »Kultúra« (Budapest VI., Sztálin-út 21. Bankkonto Nr. 45-790-057-50-032) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.