

In this connection, mention should be made of DE DEKEN-GRENSON's paper³ evaluating the rate of PNA replacement in relation to the rate of protein synthesis. She compared the rate of protein synthesis (amount of protein synthesised per unit time in percentage of the total amount of protein present) with the *relative* rate of PNA replacement (amount of PNA replaced per unit time in percentage of total amount of PNA present). The vast discrepancy of the rate of PNA replacement between the pancreas and the oviduct, in contrast to a fairly good coincidence in the rate of protein synthesis of the two organs, led her to conclude that there is no direct quantitative relationship between the protein synthesis and PNA replacement. This conclusion is obviously irrelevant, however, because the two quantities have been compared at different levels with regard to the reference standard. By expressing the rate of PNA replacement in a relative measure proportional to the amount of PNA replaced per unit weight of tissue which largely consists of proteins (*cf.* col. 5-6, 4 and 4 of Tables I, II and III, respectively), a direct comparison of the two quantities may become feasible. It now turns out that the two organs in question show no significant difference in both the rate of protein synthesis and the rate of PNA replacement.

This argument may still be insufficient to invalidate the DE DEKEN-GRENSON's conclusion concerning the lack of direct connection between PNA replacement and protein biosynthesis, because she and also HOKIN AND HOKIN⁵ demonstrated that the experimentally induced synthesis of digestive enzymes in pancreas failed to augment the incorporation of radiophosphate into PNA both *in vivo* and *in vitro*. Several recent findings^{6,7} suggest that the synthesis of enzyme proteins in micro-organisms require a concomitant synthesis of PNA. But the degradation of PNA obviously has no intimate bearing on the protein synthesis^{4,8,9}. It is not implied here, however, that the replacement (actually, the biosynthesis or degradation, or even both) of PNA in mammalian or avian tissues is in some way linked to protein synthesis. It should rather be emphasised that the biological significance of the replacement of PNA in growing¹ as well as non-growing organs of higher animals, as demonstrated by tracer technique, still remains an open question.

Department of Cytochemistry and Histology, Yamaguchi Medical School,
Ube (Japan)

HIROZI K. KIHARA
MINORU AMANO
HASHIM IKEMOTO
ATUHIRO SIBATANI

¹ V. ALLFREY, M. M. DALY AND A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 37 (1953) 157.

² M. DE DEKEN-GRENSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 560.

³ M. M. DALY, V. G. ALLFREY AND A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 36 (1952) 173.

⁴ Y. FUJISAWA AND A. SIBATANI, *Experientia*, 10 (1954) 178.

⁵ L. E. HOKIN AND M. R. HOKIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 401.

⁶ A. B. PARDEE, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 40 (1954) 263.

⁷ S. SPIEGELMAN, cited by E. R. STADTMAN, *Science*, 120 (1954) 589.

⁸ L. A. MANSON, *J. Bacteriol.*, 66 (1953) 703.

⁹ A. D. HERSHEY, *J. Gen. Physiol.*, 38 (1954) 145.

Received February 26th, 1955

Zur biologischen Wirkung von Cytochrom c

Eigene Untersuchungen bei Vergiftungszuständen mit Malachitgrün bei Ratten und Hunden lassen Beziehungen zwischen diesem Farbstoff und Cytochrom *c* *in vivo* erkennen, die 3 grosse Fragenkomplexe umfassen, deren Bearbeitung für das Verständnis der biologischen Wirkungsweise des Cytochroms *c* nützlich zu sein vermag.

1. Die Malachitgrünvergiftung ist im Tierversuch durch Cytochrom *c* zu beeinflussen, sodass sich hieraus die Möglichkeit einer Testierung der biologischen Wirkung von Cytochrom-*c*-Präparationen ergibt.

2. Die Malachitgrünvergiftung führt zu Veränderungen am Elektrokardiogramm von Ratten und Hunden, die bei Gabe von Cytochrom *c* reversibel sind. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf den Energiestoffwechsel des Herzens und insbesondere des Reizleitungssystems ziehen.

3. Der "Cytochrom-*c*-Defekt" (H. von EULER) bei tumortragenden Ratten (Walker-Carzinom) wirkt sich auf die Malachitgrüntoleranz der Tiere in einheitlicher Weise aus, das heisst, sie sinkt deutlich ab. Dem parallel geht ein Speicherungsvermögen von Malachitgrün im Tumorgewebe in einer noch unbekannten Leucoform. Das Tumorgewebe wird hierdurch beeinflusst, seine Übertragbarkeit wird deutlich geschädigt.

Zu 1. Die intravenöse oder intraperitoneale Vergiftung mit Malachitgrün führt bei Ratten und Hunden unter den Erscheinungen von Atemnot, beschleunigter, ruckartiger Atmung und Cyanose, Schleimhautblutungen und final Auftreten von schaumig-blutigem Sekret aus Maul und Nase, zum Tode. Dem entspricht pathologisch-anatomisch ein schweres Lungenödem mit Blutungen in die Alveolen. Auch im Herzmuskel lassen sich, vorwiegend in der Gegend des Verlaufes des Reizleitungs-

systems, Hämorrhagien nachweisen. Bei unserem Rattenstamm liess sich eine Dosis letalis von 3 mg/100 g Körpergewicht, intravenös oder intraperitoneal verabfolgt, ermitteln. Die Dosis letalis erweist sich als vollständig paralisierbar durch Cytochrom *c*, wenn dieses, unmittelbar im Anschluss an die intravenöse Injektion des Farbstoffes, ebenfalls intravenös, gegeben wird. Die intraperitoneale Injektion von Cytochrom *c* ist wirkungslos. Bei den besten bisher untersuchten Chargen von Cytochrom-*c*-"Mack" waren hierzu die doppelte Menge erforderlich, also kamen auf 3 mg Malachitgrün "Merk" je 100 g Körpergewicht, jeweils 6 mg Cytochrom *c*. Von weniger wirksamen Chargen waren zur gleichen Wirkung grössere mg-Mengen notwendig. Müssen mehr als 8 mg/100 g Körpergewicht verabfolgt werden, so beobachtet man häufig Nebenwirkungen. Es kann dann zum Auftreten eines generalisierten Tremors, Manegengang und ähnlichen Symptomen kommen, die auf die Zuführung artfremden Eiweisses bezogen werden können. Derartige Präparate enthalten wahrscheinlich noch Eiweissanteile auf Kosten des Bestandes an wirksamem Ferment.

Zu 2. Verabfolgt man Ratten oder Hunden toxische Dosen von Malachitgrün, so kommt es im Elektrokardiogramm zu den Veränderungen, wie sie unter einer Anoxämie zustandekommen. Die in unseren Versuchen beobachteten Abweichungen im EKG entsprechen den beschriebenen Zeichen des 3. Grades der Anoxämie des Herzmuskels¹, die z.B. bei der Höhenkrankheit oder im Unterdruckversuch auftreten. Im EKG des malachitgrün-vergifteten Hundes erkennt man ausserdem Störungen, die auf eine Beteiligung des Reizleitungssystems hinweisen. Pathologisch-anatomisch entsprechen diesen EKG-Befunden die bereits erwähnten Hämorrhagien im Myocard, insbesondere in der Gegend des Verlaufes des Reizleitungssystems. Intravenöse Gaben von Cytochrom *c*, und zwar der doppelten mg-Menge des verabfolgten Malachitgrüns entsprechend, vermögen alle diese Abweichungen im EKG zu normalisieren. Diese Befunde scheinen uns von besonderem Interesse, da das Cytochrom *c* sich in der Behandlung verschiedenster anoxämischer bzw. toxischer Zustände des Herzens beim Menschen bereits bewährt hat^{2,3}. Die therapeutischen Erfolge sind allerdings nicht einheitlich, was vielleicht durch die unterschiedliche biologische Wertigkeit verschiedener Präparationen erklärt werden kann, die ja bisher nicht getestet werden konnten.

Zu 3. Bei Ratten, die mit Walker-Carzinom inokuliert wurden, erweist sich die Malachitgrün-Toleranz als deutlich herabgesetzt. Die Dosis letalis kann hier schon bei 0.3 bis 0.5 mg/100 g Körpergewicht liegen. Nach unseren Erfahrungen über die Wechselbeziehungen zwischen Malachitgrün und Cytochrom *c* *in vivo*, liegt es nahe, die Ursache für die herabgesetzte Toleranz in der mehrfach beschriebenen Cytochrom-*c*-Verarmung des tumorkranken Tieres zu suchen. Dem parallel geht ein Speicherungsvermögen für Malachitgrün, das im Tumor selbst in einer Leucoform gespeichert werden kann. Dies geht aus Übertragungsversuchen mit dem Walker-Carzinom der Ratte hervor. Verabfolgt man einer Ratte mit gut ausgebildetem Tumor Malachitgrün i.v. und überpflanzt eine halbe bis eine Stunde später den Tumor auf ein anderes Tier (1. Tumorgeneration), so erweist sich der Tumor als modifiziert, er ist kleiner, blutreicher und schmilzt leichter ein. Wird dieser modifizierte Tumor erneut, ohne nochmalige Vorbehandlung mit Malachitgrün, übertragen (2. Tumorgeneration), so werden die Veränderungen noch deutlicher, bei Überpflanzung dieses Tumors auf eine weitere Generation (3. Tumorgeneration) geht das Walker-Carzinom dann in der Regel ein, d.h. die 3. Generation erweist sich als nicht mehr übertragbar. Tötet man die Tiere der einzelnen Tumorgenerationen 10 Tage nach der Inokulation, so kann man im Tumor selbst, sowie im Duodenum (am Kaninchen mit Choledochusfistel konnten wir nachweisen, dass Malachitgrün über die Leber ausgeschieden wird), eine deutliche Blaufärbung beobachten, die vor allem unter dem Einfluss von Formalin, nicht jedoch unter Einwirkung von Säuren oder Basen, sichtbar wird. Mit dem Tumorumogenisat muss demnach Malachitgrün in einer Leucoform, die wir bisher nicht identifizieren konnten, übertragen werden. Der Farbstoff teilt sich also auch den neu wachsenden Tumorzellen mit, und zwar in einer Konzentration, die das Gewebe noch über mehrere Generationen zu schädigen vermag, sodass es schliesslich zu Grunde geht.

Malachitgrün wurde⁴ als Glykosegift beschrieben. Es hemmt in Schnitten von Flexner-Joblingschem-Rattencarcinom die Tumorglykolyse um 74 %. Am Ascitestumor der Maus wurde⁵ das Malachitgrün wirksam gefunden. Unter dem Schutz von Cytochrom *c* kann tumortragenden Tieren eine Dosis dieses Farbstoffes zugeführt werden, die zu deutlichen Wirkungen auf das Tumorgewebe führt, zumal dieses offenbar dafür ein Speicherungsvermögen besitzt. Behandlungsversuche am Ascitestumor der Maus und am Walker-Carzinom der Ratte sind unter diesen Versuchsbedingungen im Gange und erscheinen aussichtsreich.

G. WERTH

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität des Saarlandes,
Homburg (Saar)

¹ Übersicht bei: E. LEPESCHKIN, *Das Elektrokardiogramm Kreislaufbücherei*, Bd. 7, 1942.

² S. RUFF, H. FEDKE UND R. AMMON, *Z. Kreislaufforsch.*, 39 (1949) 146.

³ G. BIÖRCK, *Cardiologia*, 18 (1951) 11.

⁴ M. YABUSOE, *Biochem. Z.*, 168 (1926) 227.

⁵ M. REED-LEWIS UND P. PH. GOLAND, *Cancer Research*, 13 (1953) 130.

Eingegangen am 7. März 1955