

rine dans les filtrats de culture de bacilles tuberculeux humains et bovins à l'aide du *Lactobacillus fermentum* 36.

A. LUTZ

Institut de bactériologie et d'hygiène de la Faculté de médecine, Lausanne, le 21 avril 1947.

### Summary

The tubercle bacillus of the human, bovine, and avian types and the BCG synthesize aneurine, which diffuses into the cultural medium (synthetic medium of SAUTON), in which we have determined it by means of the Phycomyces test.

### Aufhebung der Thermothyrin-A-Sekretion der Schilddrüse durch Fütterung mit Methylthiouracil

In früheren Arbeiten<sup>1</sup> hatte ich zeigen können, daß die Wärmetoleranz von thyreoidektomierten Tieren (Meerschweinchen und Kaninchen) bedeutend eingeschränkt ist. Geraten solche Tiere in ein Milieu von ungewohnt hoher Temperatur (Thermostat von 34–35°C), so steigt ihre Körpertemperatur schneller und höher als die der normalen Kontrolltiere. Eine zahlenmäßige Auswertung der Hyperthermie geschah mit Hilfe der sogenannten «Zeit-Wärme-Flächen», die man durch planimetrisches Ausmessen der Temperaturkurven erhält. Die Differenzen sind statistisch berechnet hoch signifikant.

Die herabgesetzte Wärmetoleranz, nach Entfernung der Schilddrüse, wird durch Verabreichung von Thyroxin weder zum Verschwinden gebracht noch gebessert – im Gegenteil, die mit Thyroxin behandelten schilddrüsenlosen Tiere ertragen die Überhitzung noch schlechter. Deshalb betrachten wir das Ergebnis dieser Versuche als eine Ausfallscheinung des einen der beiden thyroxinantagonistischen Schilddrüsenhormone, des *Thermothyriins A* («Kühlhormon» MANSFELDS), das bekanntlich dann ausgeschüttet wird, wenn der Organismus der Gefahr einer Überhitzung ausgesetzt ist und die oxydativen Prozesse im Interesse der Wärmeregulation herabzusetzen vermag<sup>2</sup>.

In denselben Arbeiten<sup>1</sup> habe ich auch gezeigt, daß Tiere, die eine Zeitlang mit Methylthiouracil gefüttert wurden, in Überwärmungsversuchen ebenfalls leichter und höher überhitzt werden als die Kontrollen, sie benehmen sich also bezüglich der Wärmetoleranz ähnlich wie schilddrüsenlose Tiere. Diese Beobachtung sprach für die Möglichkeit, daß das Methylthiouracil – von dem angenommen wird, daß es die Thyroxinsynthese in der Schilddrüse hemmt bzw. aufhebt – auch die Sekretion des Thermothyriins A einzustellen imstande ist.

Um diese Frage zu prüfen, wurden Versuche an Kaninchen, Hunden und Ratten angestellt. Angewendet wurde das MANSFELDSche Originalverfahren<sup>3</sup> zur Demonstration der Thermothyrinwirkung. Die Grundlage der Methode ist, daß das eiweiß- und lipoidfreie Serum eines überhitzten Tieres («Wärmeserum») den Grundumsatz eines Normaltieres herabsetzt. Als Wärmeserumsender dienten Kaninchen und Hunde, die 5 Stunden lang in einem Thermostaten von 34–35°C ge-

halten wurden, wobei sie einen mäßigen Anstieg der Körpertemperatur zeigten. Das aus der Jugularvene genommene Blut wurde nach Gerinnung zentrifugiert, das so gewonnene Serum mit fünffachem Volumen Alkohol enteiweißt, das Filtrat mit Äther von Lipoidsubstanzen befreit. 2,5 cm<sup>3</sup> des so präparierten Serums wurde Ratten subkutan eingespritzt. Der Grundumsatz der Ratten wurde vorher in mehrtagigen Vorperioden in mehreren Einzelbestimmungen festgestellt. Die Stoffwechselbestimmungen wurden mit dem Apparat von BELÁK und ILLÉNYI<sup>1</sup> ausgeführt, der die gleichzeitige Messung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs (volumetrisch) und der CO<sub>2</sub>-Produktion (titrimetrisch) ermöglicht. Die Innentemperatur des Apparates betrug 29°C, da es bei solchen Versuchen sehr wichtig ist, daß die Umgebungstemperatur innerhalb der – für das gewählte Tier – rassenspezifischen Behaglichkeitszone liege, damit die chemische Wärmeregulation weder in positiver noch in negativer Richtung beeinflußt werde. Die Stoffwechselbestimmungen wurden regelmäßig 2 (manchmal 3), 5, 7 (manchmal 9), 24 (manchmal 48) Stunden nach Injektion der Wärmesera vorgenommen.

Nachdem die Wirksamkeit der Wärmesera in der eben beschriebenen Weise festgestellt wurde, erhielten die Blutspender 4 Wochen lang Methylthiouracil (Cheft. Fabrik Egger, Budapest), und zwar Tagesdosen von 0,10 g/kg *per os* in Suspension durch die Magensonde. Nach dieser Behandlung wurden die Überwärmungsversuche wiederholt.

In Tabelle I und II sehen wir den Verlauf von zwei Versuchen über die Wirkung der Wärmesera vor und nach Methylthiouracilbehandlung; sämtliche Versuchsergebnisse sind in Tabelle III zusammengestellt. Man sieht, daß die Wärmesera normaler Tiere – wie das bekannt ist – den Grundumsatz der Ratten ausnahmslos herabsetzte. Eine Abnahme des Stoffwechsels konnte meistens schon 3 Stunden nach der Seruminkjektion beobachtet werden, sie erreichte ein Maximum nach 5 bis 7 Stunden (ausnahmsweise nach 9 Stunden) und war in der überwiegenden Mehrzahl der Versuche nach 24 Stunden abgeklungen. In einem Fall dauerte der Effekt 48 Stunden lang.

Wie man aus der zweiten Kolonne der Tabelle III sieht, konnte der Grundumsatz der Ratten mit den nach Methylthiouracilbehandlung gewonnenen Wärmesera nicht mehr herabgesetzt werden. Die Differenzen liegen innerhalb der Fehlergrenze.

Die zahlenmäßigen Angaben über die Wirksamkeit der Wärmesera vor und nach Methylthiouracilfütterung wurden – als kleine Stichproben aus zwei Grundgesamtheiten betrachtet – einer mathematisch-statistischen Beurteilung unterzogen<sup>2</sup>. Die Differenzen zeigten sich hoch signifikant (*P* < 0,001).

Um sicher zu sein, daß die Kaninchen und Hunde tatsächlich unter Methylthiouracilwirkung gestanden sind, wurden die Tiere nach den Versuchen getötet und die Schilddrüsen histologisch bearbeitet. (Für die mikro-

<sup>1</sup> S. BELÁK und A. ILLÉNYI, Biochem. Z. 281, 27 (1935).

<sup>2</sup> Nach den Formeln:

$$s_d^* = \frac{1}{N_1 + N_2 - 2} \left[ \sum_{i=1}^{N_1} S_i (x'_i - \bar{x}')^2 + \sum_{i=1}^{N_2} S_i (x''_i - \bar{x}'')^2 \right];$$

$$t = \frac{\bar{x}' - \bar{x}''}{s_d^*} \sqrt{\frac{N_1 N_2}{N_1 + N_2}}; n = N_1 + N_2 - 2.$$

aus A. LINDER, Statistische Methoden. Birkhäuser, Basel 1945, S. 53.

<sup>1</sup> B. v. BERDE, Exper. 2, 498 (1946); Acta Hungarica physiologica 1947 (im Druck).

<sup>2</sup> G. MANSFIELD, Die Hormone der Schilddrüse und ihre Wirkungen. B. Schwabe, Basel 1943. S. 164ff.

<sup>3</sup> G. MANSFIELD, Die Hormone der Schilddrüse und ihre Wirkungen. B. Schwabe, Basel 1943. S. 164ff.

skopische Untersuchung des Materials sowie das hier mitgeteilte Mikrophotogramm habe ich Herrn Adjunkt Dr. L. DÁNOS [Pathologisches Institut der Universität Pécs] zu danken.) Die Schilddrüsen zeigten die von den englischen und amerikanischen Forschern für Thiouracilwirkung charakteristisch gefundenen «Basedow-ähnlichen» Veränderungen: Hyperämie, hohes hyperplastisches Epithel, Kolloidschwund. Ein Beispiel ist auf Fig. 1 zu sehen. Es liegt also außer Zweifel, daß das angewendete Methylthiouracil schilddrüsenwirksam war.

Tabelle I

Wirkung von  $2,5 \text{ cm}^3$  Wärmeserum eines Normalkaninchens auf den Stoffwechsel der Ratte

	$1 \text{ O}_2/24 \text{ Std.}$	$1 \text{ CO}_2/24 \text{ Std.}$	R.Q.	Cal/24 Std.	Differenz
Grundumsatz . . .	3,574	2,808	0,78	17,1	
1,5 Stunden nach der Injektion . . .	3,410	2,711	0,79	16,3	
3 Stunden nach der Injektion . . .	3,335	2,628	0,77	15,8	
5 Stunden nach der Injektion . . .	2,301	1,915	0,83	11,1	- 35 %
7 Stunden nach der Injektion . . .	2,737	2,509	0,92	13,5	
24 Stunden nach der Injektion . . .	3,679	2,947	0,80	17,6	

Tabelle II

Wirkung von  $2,5 \text{ cm}^3$  Wärmeserum eines Methylthiouracilkaninchens auf den Stoffwechsel der Ratte

	$1 \text{ O}_2/24 \text{ Std.}$	$1 \text{ CO}_2/24 \text{ Std.}$	R.Q.	Cal/24 Std.	Differenz
Grundumsatz . . .	3,595	3,274	0,91	17,7	
2 Stunden nach der Injektion . . .	3,945	3,296	0,83	19,0	+ 7 %
5 Stunden nach der Injektion . . .	3,396	3,071	0,90	16,7	
7 Stunden nach der Injektion . . .	3,360	3,085	0,91	16,6	- 5 %
24 Stunden nach der Injektion . . .	3,815	3,230	0,85	18,5	

Tabelle III

Wirkung der Wärmesera auf den Stoffwechsel von normalen Ratten

Nr.	SpenderTier	Maximale Änderung des Stoffwechsels nach Injektion von $2,5 \text{ cm}^3$ Wärmeserum gewonnen	
		vor Methylthiouracilbehandlung	nach Methylthiouracilbehandlung
1.	Kaninchen	- 35 %	- 5 %
2.	Kaninchen	- 22 %	+ 3 %
3.	Kaninchen	- 48 %	- 7 %
4.	Kaninchen	- 17 %	+ 1 %
5.	Kaninchen	- 46 %	- 8 %
6.	Kaninchen	- 22 %	+ 4 %
7.	Hund	- 14 %	- 4 %
8.	Hund	-	- 5 %
		Mittelwert - 29 %	Mittelwert - 3 %
$P < 0,001$			

Aus den Versuchen geht hervor, daß die stoffwechselhemmende Wirkung der Wärmesera verlorengeht, wenn die Spendertiere vorher mit Methylthiouracil gefüttert werden. Diese Tatsache kann – unserer Meinung nach – nur so gedeutet werden, daß das Methylthiouracil die Sekretion des Thermothyryns A (Kühlhormon) in der Schilddrüse aufhebt.

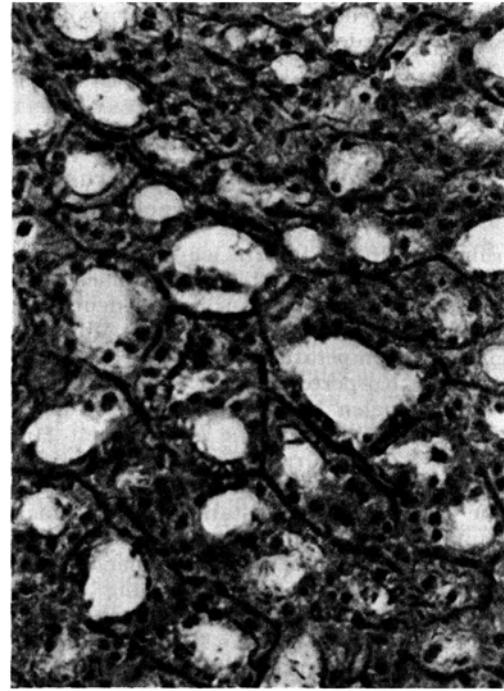


Fig. 1. Mikrophotogramm aus der Schilddrüse eines Methylthiouracil-kaninchens.

Zahlreiche Versuche an Menschen, Tieren, *in vitro*, und Beobachtungen mit Hilfe des Metamorphosetestes sprechen dafür, daß der Angriffspunkt der Thiouracilderivate in dem Schilddrüsenepithel zu suchen ist. Als biochemische Erklärung der Wirkung wurde bisher die Aufhebung der Thyroxinsynthese durch Hemmung der Jodierungsprozesse betrachtet<sup>1</sup>. Unsere hier mitgeteilten Versuche dienen als Beweis dafür, daß die Thiouracilderivate eine viel allgemeinere Wirkung in der Schilddrüse ausüben, vielleicht sogar die ganze innersekretorische Funktion der Schilddrüse hemmen. Für diese Möglichkeit sprechen unsere Versuche, in denen es gelungen ist, die Sekretion des Thermothyryns A durch Methylthiouracilfütterung aufzuheben, obwohl das Thermothyryrin A (von der Formel  $C_{20}H_{40}O$  oder  $C_{20}H_{42}O$ ) kein Jod enthält<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> A. L. FRANKLIN, S. R. LERNER und I. L. CHAIKOFF, Endocrinology 34, 265 (1944). - E. B. ASTWOOD und A. BISSEL, Endocrinology 34, 282 (1944). - R. W. RAWSON, I. F. TANNHEIMER und W. PEACOCK, Endocrinology 34, 245 (1944). - A. S. KESTON, E. D. GOLDSMITH, A. S. GORDON und H. A. CHARIPPER, J. biol. Chem. 152, 241 (1944). - A. COUCEIRO, L. G. VIEIRA und J. DE MORAES, Rev. bras. biol. 4, 173 (1944). - R. W. RAWSON und andere, J. clin. Endocrinology 4, 1 (1944). - A. L. FRANKLIN und I. L. CHAIKOFF, J. biol. Chem. 152, 295 (1944). - A. L. FRANKLIN, I. L. CHAIKOFF und S. R. LERNER, J. biol. Chem. 153, 151 (1944).

<sup>2</sup> ANNA MANSFELD, Schweiz. med. Wschr. 76, 439 (1946); Nature 157, 491 (1946).

Frl. MARIA SCHNELL bin ich für die technische Hilfe zu Dank verpflichtet.

B. von BERDE

Physiologisches Institut der Universität Budapest,  
den 26. Februar 1947.

### Summary

G. MANSFELD demonstrated that in the serum of overheated animals a substance (thermohydrine A) is present which, injected into normal animals, decreases O<sub>2</sub>-consumption. Serum of thyroidectomized animals has no effect.

Dogs and rabbits were treated daily with 0.10 g per kg methylthiouracil during 4 weeks, and were then subjected for 5 hours to a temperature of 34–35° C which raised their body temperature by 0.5–1.5° C. 2.5 cm<sup>3</sup> of serum obtained at the end of the 5 hours period failed to reduce O<sub>2</sub>-consumption of normal rats, while sera of untreated dogs and rabbits produced after similar exposure to high temperature a fall of O<sub>2</sub>-consumption by 14–48%. It is therefore evident that methylthiouracil not only inhibits the formation of thyroxine but of thermohydrine A as well.

The fact that thermohydrine A contains no iodine proves conclusively that the action of thiouracil compounds cannot be exclusively an inhibition of iodination.

### PRO LABORATORIO

#### Über eine neue Präparationsmethode für elektronenmikroskopische Untersuchungen

Bei der Untersuchung von sehr feinen dispersen Teilchen im Elektronenmikroskop hat man immer mit großen Schwierigkeiten zu kämpfen bezüglich der für das Mikroskop geeigneten Präparation.

Gewisse Teilchen lassen sich zwar gut in Wasser dispergieren und dann auf die Objektträgerfolie in Tropfensuspension bringen. Bei vielen Teilchen aber entsteht beim Austrocknen wieder eine starke Aggregation in größeren Komplexen, welche eine geeignete elektronenmikroskopische Untersuchung verhindert. Viele Substanzen lassen sich übrigens gar nicht in flüssige Suspension bringen. Es wurde daher eine neue Methode gesucht, um diese Schwierigkeiten zu umgehen:

Es ist bekannt, daß kleine Teilchen durch hochgespannten Gleichstrom zerstäubt werden. Diese Art der Zerstäubung wird auch in der sogenannten elektrischen Entstaubung verwendet oder, wie neuerdings bekannt, zum Aufstauben von Schwefel auf Reben. Ein Versuch mit dieser Methode hat aber gezeigt, daß nur die verhältnismäßig großen Teilchen durch die Hochspannung weggestäubt werden. Überraschenderweise hat man feststellen können, daß die kleineren Teilchen schwer zerstäubbar sind und auf der Unterlage haften bleiben. Dies röhrt daher, weil bei den großen Teilchen durch die Hochspannungsaufladung die elektrischen Kräfte die Adhäsionskräfte überwiegen. Bei den kleinen Teilchen dagegen überwiegen die Adhäsionskräfte an der Unterlage und die Teilchen bleiben daher bei dieser elektrischen Zerstäubung zurück. (Es ist ein ähnlicher Vorgang wie bei den Kometenschweifen, welche immer von der Sonne abgewendet sind, weil der Lichtdruck auf die Teilchen des Schweifes bei einer gewissen Teilchen-

größe die Anziehung durch Gravitation überwiegt. Die Anziehung geht proportional  $d^3$ , die Abstoßung proportional  $d^2$ , wenn  $d$  der Teilchendurchmesser ist.)

Die Präparation auf diese Art ist sehr einfach. Man braucht nur eine elektrostatische Maschine, von der ein Pol mit einer Spitze verbunden ist, welche auf einer Glasplatte aufliegt. Auf der Glasplatte verteilt man eine Anzahl Objekträger vom Elektronenmikroskop, welche mit Trägerfolien versehen sind, und auf diese Trägerfolien wird die vorher nach üblichen Methoden zerteilte Substanz trocken aufgestäubt. Sobald Hochspannung an die Spitze gelegt wird, fliegen alle größeren Teilchen weg und nur die allerfeinsten bleiben auf der Folie haften. Mit einer Veränderung der Hochspannung kann eine gewisse Selektion der Teilchengröße bewirkt werden.

Die Methode eignet sich auch zur Präparation von staubförmigen Substanzen auf Drahtnetzen ohne Trägerfolie, weil hier wiederum nur diejenigen Teilchen an den Netzdrähten haften bleiben, bei welchen die Adhäsionskräfte die elektrischen Kräfte überwiegen.

G. INDUNI

Laboratorium der Firma Trüb, Täuber & Co. AG., Zürich den 8. Mai 1947.

### Summary

The author suggests a new method of preparation of particles for investigation with the electronic microscope. In general it is very difficult to obtain a suitable distribution of these small particles. The method is based on the different effects of adhesion forces and electric forces on the particles as a function of their size.

#### Eine Methode zur Bestimmung des Endpunktes der Sol-Gel-Umwandlung bei der Plasmagerinnung

Um den Gehalt eines Blutplasmas an Prothrombin zu bestimmen, bedient sich das klinisch-chemische Laboratorium zumeist der von QUICK<sup>1</sup> angegebenen Einstufenmethode. Dazu werden die Gerinnungsfaktoren Thromboplastin, Ca und Fibrinogen bestmöglich konstant gehalten, so daß als Variable der Prothrombingehalt des zugesetzten Blutplasmas übrigbleibt. Als Meßwert dient die Zeit, welche notwendig ist, bis das Kettenwachstum der Fibrinfäden die Größenordnung von >0,1 mm erreicht und damit von Auge sichtbar wird. Es wird vorausgesetzt, daß sowohl die Aktivierung des Prothrombins zum Thrombin wie die Umwandlung des Fibrinogens zum Fibrin zeitlich konstant verläuft und dadurch vergleichbar ist. Normalerweise benötigt ein menschliches Blutplasma 11–12 Sekunden bis zum Erscheinen der ersten Fibrinfäden. Diese äußerst knappe physiologische Schwankungsbreite macht die Methode stark von Zeitmessungsfehlern abhängig. Sie liefert deshalb nur in der Hand des Geübten zuverlässige Resultate.

Um eine Routinemethode zu schaffen, welche die erwähnten subjektiven Momente möglichst ausschließt, haben wir die Beobachtungszeit auf das 10–20fache verlängert, indem wir als Endpunkt der Zeitmessung die vollendete Sol-Gel-Umwandlung wählen, somit jenen Moment, wo das Proteinsol seine Fließfähigkeit verliert und zum gallertartigen Gel erstarrt. Dazu haben wir eine Vorrichtung geschaffen, welche gestattet, bis zu 5 Röhrchen so in eine Wippe zu klemmen, daß sie zwar

<sup>1</sup> A. J. QUICK, The Hemorrhagic Diseases. Springfield, U.S.A., 1942, S. 312.