

Unter dem Einfluß von Penicillin Squibb beobachtete DE ROPP¹ bei Stengelkulturen von Sonnenblumen eine Adventivwurzelbildung und vermutet Heteroauxin als wahrscheinliche Ursache. GEIGER² zeigte, daß sehr kleine Konzentrationen (10^{-8} Mol) von Heteroauxin das Längenwachstum von Maiswurzeln stark hemmen, was wir bestätigen konnten. Es lag deshalb die Vermutung nahe, daß Heteroauxin als Verunreinigung des Handelspenicillins die Ursache der Hemmung sein könnte.

Der hemmende Faktor erwies sich als thermostabil: autoklaviertes Penicillin ergab eine ebenso starke Hemmung wie das nicht erhitzte. Der Faktor ist aus schwach sauren wässrigen Lösungen durch Äther extrahierbar, was auch für Heteroauxin gilt.

Andererseits hat ein Zusatz von reinem Na-Penicillin G, das wir der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, verdanken, in einer Konzentration von 150 OE/cm³ keinen hemmenden Einfluß auf das Wurzelwachstum.

Als weitere Aufgabe stellte sich der chemische Nachweis der β -Indolylessigsäure durch eine spezifische Farb-reaktion. Wir wählten dafür die Reaktion mit Cu-Sulfat, Glyoxylsäure + Schwefelsäure (SUTTER³), was eine rotviolette Färbung ergibt. Maßgeblich für die Farbstoffbildung ist offenbar die Anwesenheit eines Indolrestes, denn auch andere Indolderivate ergeben Färbungen. Wir erhielten blauviolette Färbung mit Tryptophan, rotviolette mit β -Indolylessigsäure und grünlichblaue Färbung mit Ergotamin. Trotz des geringen konstitutionellen Unterschiedes von Tryptophan und β -Indolylessigsäure erhält man deutlich verschiedene Farbnancen, die eine Verwechslung kaum zulassen. Wir glauben deshalb, daß die Spezifität der Farb-reaktion auf β -Indolylessigsäure eine sehr hohe ist, wenn die Farbnuance als Kriterium herangezogen wird.

Ein direkter Nachweis der β -Indolylessigsäure aus wässriger Penicillinlösung kam indessen nicht in Frage, da eine eventuelle Farb-reaktion durch die starke Gelbfärbung des Handelspenicillins verdeckt wird. Es war deshalb notwendig, eine weitgehende Trennung von β -Indolylessigsäure und gelben Farbstoffen vorzunehmen. Wir versuchten, die Trennung chromatographisch durch Adsorption an Aluminiumoxyd, standardisiert nach BROCKMANN, durchzuführen. Dabei führte die chromatographische Adsorption aus wässriger Lösung zu keiner sauberen Abtrennung des Hormons von den gelben Farbstoffen. Wir versuchten deshalb eine Anreicherung der Substanz durch Ätherextraktion aus angesäuerter wässriger Lösung. Der gelbe Extrakt wurde auf wenige cm³ eingengt, an Al-Oxyd chromatographiert und das Chromatogramm mit Äther entwickelt. Die Säule wurde empirisch in fünf Zonen zerlegt und jede Schicht mit wenig Wasser eluiert. Mit Glyoxylsäure ergaben die oberen drei Zonen des Chromatogramms gelbe bzw. stark braungelbe Färbung; die vierte und fünfte Zone dagegen zeigten rein rotviolette Farbe. Wenn wässrige Penicillinlösungen oder Ätherextrakte direkt untersucht werden, so zeigt sich immer eine stark gelbe oder braungelbe Färbung, was den Nachweis von β -Indolylessigsäure verunmöglicht. Durch die Chromatographie von Ätherextrakten konnte der störende braungelbe Färbung verursachende Stoff sauber vom Heteroauxin abgetrennt werden. Die erhaltene Farbnuance entspricht der mit reiner β -Indolylessigsäure erhaltenen; damit ist der spezifische chemische Nachweis von β -Indolylessigsäure weitgehend gesichert.

Die Bedeutung des Ergebnisses sehen wir hauptsächlich darin, daß Handelspenicillin neben den wirksamen Penicillinen noch weitere Wirk- und Hemmstoffe enthält. Es darf nie vergessen werden, daß Handelspenicillin ein eingengtes Kulturfiltrat eines Pilzes darstellt, das relativ wenig gereinigt ist und eine große Zahl der Stoffwechselprodukte des Pilzes, die z. T. biologische Aktivität besitzen, mehr oder weniger angereichert enthält. Es ist wohl bekannt, daß Heteroauxin durch Mikroorganismen, namentlich durch Schimmelpilze (z. B. *Rhizopus suinus*), reichlich synthetisiert, im Kulturmilieu ausgeschieden und angereichert wird.

Die Konzentration von Heteroauxin im Handelspenicillin Squibb ist eine sehr hohe; 5 OE/cm³ hemmen das Wachstum von Maiswurzeln stark. Eine 100–1000-mal kleinere Konzentration würde das Wachstum fördern, denn das Optimum der Wirkung liegt für Heteroauxin bei 10^{-11} Mol. Ferner werden Mikroorganismen auch durch Heteroauxin im Sinne einer Förderung oder Hemmung des Wachstums beeinflusst.

Bei wissenschaftlichen Versuchen mit Handelspenicillin scheint uns deshalb eine gewisse Gefahr in der Tendenz zu liegen, beobachtete biologische Einflüsse ohne weiteres der Wirkung des Penicillins zuzuschreiben. Der sichere Beweis für eine Penicillinwirkung scheint uns nur dann erbracht, wenn die Wirkung des Handelspenicillins mit der Wirkung von Reipenicillin im entsprechenden Kontrollversuch übereinstimmt.

1. Reines Na-Penicillin G (150 OE/cm³) hat keinen hemmenden Einfluß auf das Wachstum von Wurzelkulturen von *Zea mays*.

2. Handelspenicillin enthält Heteroauxin; dieses konnte chromatographisch stark angereichert und kolorimetrisch identifiziert werden.

M. BEIN, R. SIGNER und W. H. SCHOPFER

Botanisches und organisch-chemisches Institut der Universität Bern, den 22. Mai 1947.

Summary

(1) Pure Penicillin Sodium G (150 U/cm³) gives no inhibition in the growth-rate of *mays*-roots in sterile organ culture.

(2) Commercial penicillin (Penicillin Sodium Squibb, 5 U/cm³) inhibits the growth-rate of *mays*-roots in a fairly high degree, due to its content of indole acetic acid. We have been able to separate the substance from the yellow dyes of commercial penicillin by chromatographic adsorption and to identify it colorimetrically as indole acetic acid.

Sul meccanismo di azione della vaccinoterapia nella infezione tifoidea

Il siero di sangue degli ammalati di tifo acquista sotto l'azione del vaccino, una evidente proprietà batteriolitica, duratura nei casi che volgono a guarigione, labile nei casi in cui la malattia continua il suo decorso¹: provocando sul bacillo del tifo le stesse alterazioni quali si notano per azione della penicillina².

Lo studio del meccanismo di azione della penicillina ci ha portati alla conclusione che la penicillina aumenta il potenziale di ossido-riduzione nel mezzo, così da impedire gli scambi energetici dei germi³.

¹ DE ROPP, Nature 158, 555 (1946).

² GEIGER, Jb. wiss. Bot. 84, 242 (1936).

³ SUTTER, Ber. Schweiz. bot. Ges. 54, 197 (1944).

¹ F. MULÈ, La Pediatria 7-9, 395-396 (1946).

² F. MULÈ, Comun. Accad. Med. di Roma, 20 aprile 1946.

³ F. MULÈ, Annali di Igiene 6, 298-301 (1946).

L'aumento del potenziale di ossido-riduzione prodotto dalla penicillina nel mezzo, verrebbe ad inibire l'attività delle deidrogenasi batteriche o degli accettori di idrogeno delle catene enzimatiche intracellulari, provocando l'arresto della vita del germe, e conseguentemente la sua lisi.

I gruppi sulfidrilici costituiscono i più importanti sistemi ad azione ossido riduttiva delle deidrogenasi batteriche. Numerosi Autori hanno dimostrato che una larga classe di agenti antibatterici agisce per reazione con i gruppi sulfidrilici dell'enzima, e che le differenze nelle azioni antibatteriche di vari agenti sono dipendenti tra altri fattori, dalla possibilità di questi agenti di venire a contatto con i gruppi sulfidrilici essenziali¹.

Gli Autori ammettono che si può fissare all'incirca di $E_h = +110$ mV, a p_H 7, il potenziale di ossido-riduzione limite massimo che permette la crescita dei germi².

Procedendo allo studio del meccanismo di azione della vaccinatoria nella infezione tifoidea, si è portata l'indagine sulle variazioni nel sangue degli infermi, nei diversi momenti della reazione vaccinica ed oltre, del potenziale di ossido-riduzione e del glutatione, essendo questo elemento il costituente principale dei gruppi sulfidrilici.

Per la determinazione dei valori del glutatione si è seguita la tecnica di WOODWARD e FRY basata sulla titolazione iodometrica indiretta con iodato di potassio e salda d'amido come indicatore.

La misura del potenziale è stata eseguita con il metodo elettrotecnico classico, avendo come elettrodo di confronto l'elettrodo a calomelano, curando che durante tutta l'esperienza il sangue non venisse a contatto con l'aria.

Le esperienze sono state eseguite su trenta ammalati per tutta la loro degenza nell'Istituto; in essi la malattia veniva accertata sierologicamente e batteriologicamente.

Degli ammalati trattati³, il 25 % è guarito con una sola iniezione, il 35 % con due o tre vaccinazioni, il rimanente con più di tre vaccinazioni. Sono stati studiati anche tre ammalati arrivati in clinica in stato gravissimo e venuti a morte prima che si fosse intervenuti con la terapia specifica.

Si è constatato che:

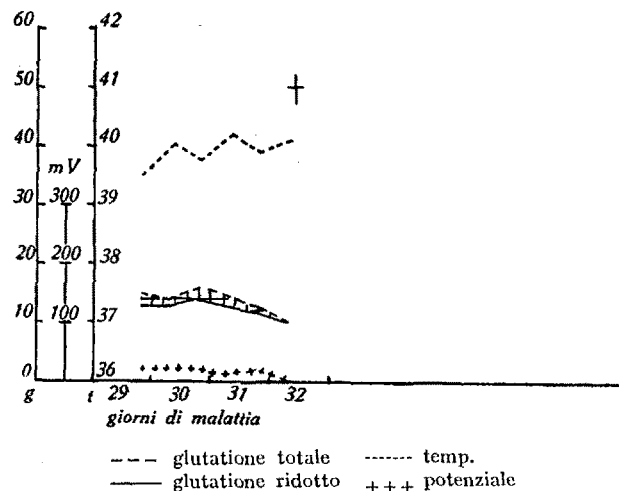
a) la glutationemia è generalmente diminuita nel sangue dei tifosi in corso di malattia, arrivando a valori che in casi gravissimi sono del 40-50 % del normale;

b) la glutationemia aumenta sotto l'azione della reazione vaccinica progressivamente, raggiungendo i valori massimi in rapporto con l'apiressia definitiva;

c) dei due valori del glutatione, ridotto e totale, quello che aumenta di più è il glutatione totale: ottenendosi un aumento del potenziale di ossido-riduzione del glutatione ematico;

d) la temperatura diminuisce con l'aumentare del glutatione ossidato, valore che risulta dalla differenza tra il glutatione totale ed il ridotto.

Il valore del potenziale di ossido-riduzione, misurato nel sangue *in toto* degli ammalati di tifo, si abbassa nel corso della malattia, per aumentare ove si ha l'evoluzione verso la guarigione; negli ammalati gravi tende a valori sempre più bassi sino ad arrivare a zero, valore raggiunto in casi mortali (grafico n.º 1), qualche ora prima del

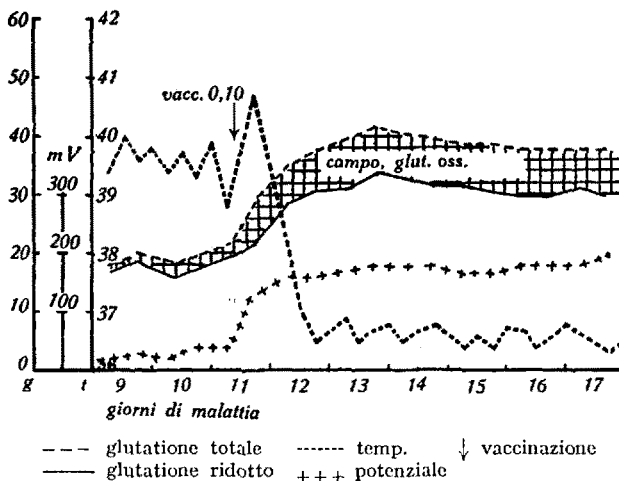


Il grafico n.º 1 appartiene ad una donna di 42 anni venuta in clinica in condizioni gravissime, in ventinovesima giornata di malattia e deceduta dopo tre giorni, prima che si fosse intervenuto con la terapia vaccinica.

I valori del glutatione sono del 40-50 % del normale; i valori del potenziale sono molto bassi.

Poche ore prima del decesso, nell'ultima determinazione, il valore del glutatione ossidato è 0 e del potenziale è 0.

Nel momento in cui le proteine del sangue non hanno più capacità ossidante cessa la vita delle cellule, si ha la morte dell'organismo.



Il grafico n.º 2 rappresenta il caso di un bambino di 9 anni arrivato in clinica in nona giornata di malattia ed il cui trattamento è stato iniziato in undicesima giornata. Alla prima iniezione di 0,10 cm³ di vaccino è seguita l'apiressia definitiva; si nota che le curve del potenziale rapidamente salgono dietro lo stimolo vaccinic, per rimanere su valori costantemente alti per diversi giorni.

I valori del potenziale che inizialmente erano sui 30-50 mV raggiungono i 150-200 mV.

I valori del glutatione aumentano per il ridotto da 18-20 a 30-35 mg, per il totale da 20-22 a 37-42 mg per 100 cm³; si nota un aumento in più dei valori del glutatione totale sul ridotto; la differenza di questi due valori ci dà il glutatione ossidato che nel grafico è rappresentato come un campo di ossido-riduzione.

¹ H. EAGLE, J. Pharmacol. 66, 436-448 (1939). - P. FILDERS, Brit. J. exp. Path. 21, 67-73 (1940). - N. ATKINSON e N. F. STANLEY, Australian J. exp. Biol. med. Sci. (4) 21, 255-257 (1943). - W. B. GEIGER e J. E. CANN, J. Am. chem. Soc. 67, 112-116 (1945).

² R. W. H. GILLESPIE e J. R. PORTER, J. Bacter. 36, 605 (1938). - R. W. H. GILLESPIE e L. F. RETTGER, ib. 36, 621, 633 (1938). - B. C. J. KNIGHT e P. FILDERS, Biochem. J. 24, 1496 (1930). - L. F. HEWITT, Biochem. J. 24, 1151 (1930).

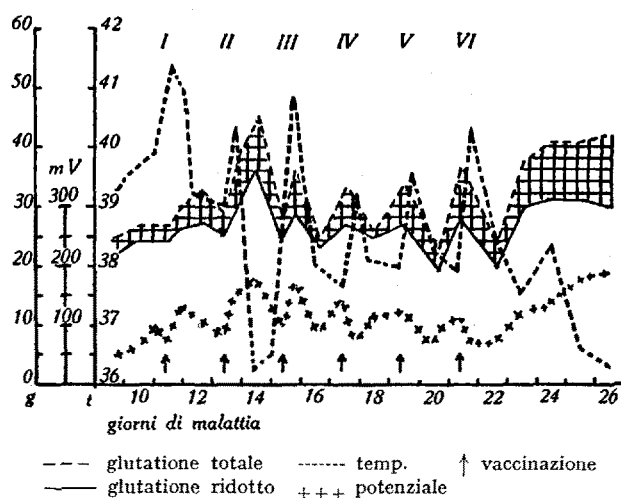
³ Per il trattamento degli ammalati si è adoperato il vaccino lisizzato secondo il metodo G. CARONIA⁴ in uso nell'Istituto.

⁴ G. CARONIA, Atti Accad. Med. Chir. di Napoli (1916); Pediatria n.º 1. (1917); Am. J. Dis. of Children 39, 1-8 (1930).

decesso. Sotto lo stimolo vaccinic il potenziale aumenta rapidamente e progressivamente fino a raggiungere valori positivi medi di 150 mV e massimi di 200-250 mV, valori che sono incompatibili con la vita dei germi.

Nei guariti con una sola iniezione (grafico n.º 2) si osserva che dopo la reazione vaccinica la curva del glutathione ossidato, che in individui normali ha un valore costante che si aggira su un mg per 100 cm³ di sangue, tende progressivamente a salire fino a raggiungere 4-5 mg in media e 10-12 mg massimo nel secondo/terzo giorno dalla vaccinazione.

Nei trattati con più vaccinazioni (grafico n.º 3) si hanno delle forti oscillazioni nei valori del glutathione ossidato e del potenziale: essi raggiungono valori alti solo per breve tempo con le prime vaccinazioni, per cui bisogna intervenire con altre vaccinazioni per provocare una stabilizzazione del potenziale.



Il grafico n.º 3 illustra il caso in una bambina di 12 anni arrivata in clinica in nona giornata di malattia ed il cui trattamento è stato iniziato in undicesima giornata. Come si nota, l'apiressia definitiva si è avuta dopo la sesta vaccinazione.

Seguendo l'andamento delle variazioni dei valori del potenziale in rapporto allo stimolo vaccinic, si nota come dopo le prime tre vaccinazioni i valori del potenziale rapidamente aumentano per ritornare il giorno dopo ai valori iniziali, mentre dopo la quarta, quinta, sesta vaccinazione allo stimolo vaccinic segue un abbassarsi dei valori del potenziale che tende ad aumentare il giorno dopo. I valori del glutathione subiscono analoghe oscillazioni.

La temperatura è influenzata di poco dall'azione del vaccino dopo la terza iniezione; dopo la sesta iniezione l'ammalata sfebbrò per lisi ed il potenziale arriva a valori di 170-180 mV.

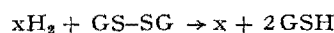
Il grafico illustra un caso appartenente a quel gruppo di ammalati in cui, come si è detto, le iniezioni che seguono la terza vaccinazione, debbono essere eseguite ogni quarto, quinto giorno.

In questi casi la risposta allo stimolo vaccinic, in rapporto all'aumento della glutathionemia e del potenziale di ossido-riduzione, non è immediata, ma si ha solo 24-48 ore dall'iniezione con una caduta della temperatura per lisi e non per crisi come nei casi precedenti. Se nel momento in cui il glutathione ossidato tende ad aumentare, si interviene con lo stimolo vaccinic, si osserva una brusca caduta della glutathionemia totale, e con essa la diminuzione del potenziale di ossido-riduzione con ripresa della temperatura ed il perdurare della malattia. Da ciò un dato indicativo nella terapia vaccinica del tifo: ove la malattia non cede con le prime due/tre vaccinazioni, le iniezioni seguenti debbono essere eseguite ogni quarto-quinto giorno.

In quanto alla dose abbiamo potuto osservare che: gli ammalati di media gravità reagiscono bene anche a dosi forti, mentre in ammalati molto gravi sono le più piccole dosi che provocano un aumento del potenziale; ove si interviene con dosi forti si ottiene una rapida caduta della glutathionemia con peggioramento delle condizioni generali dell'infermo.

Il dato che con l'aumento dei valori del glutathione ossidato coincide l'abbassarsi della temperatura, ci indica l'avvenuta paralisi della vita dei germi: ciò possiamo pensare che avvenga per ossidazione dei gruppi sulfidrilici SH dell'enzima batterico ad opera dei gruppi S-S del disolfuro di glutathione che è la forma ossidata del glutathione ematico.

Noi possiamo immaginare che il glutathione ossidato funzioni come accettore di idrogeno da parte del substrato xH₂ formato dai donatori di idrogeno secondo la seguente reazione:



ove con G si indica il resto della molecola semplice del glutathione ridotto.

Le modificazioni di equilibrio tra la forma ridotta e la forma ossidata del glutathione ematico con aumento di quest'ultima per variazione della dissociazione ionica, ci portano a considerare il meccanismo di azione della vaccinoterapia nell'infezione tifoidea secondo lo stesso schema esposto per l'azione della penicillina.

F. MULÈ

Istituto di clinica delle malattie infettive della Università di Roma, il 30 marzo 1947.

Summary

Having observed before that the blood serum of typhoid patients acquires under the stimulus of the vaccine an evident bacteriolytic action on the typhoid bacillus, we have studied variations brought about by the vaccine stimulus in the blood of the patients as to the redox-potential and to the glutathione in the blood.

It has been seen that under vaccine stimulus there is a rapid increase of redox-potential and of the glutathione in the blood: lasting in the cases which tend to recovery, temporary in the cases in which the illness takes its natural course.

The values of the total glutathione increase more than those of reduced glutathione, so that an increase of the values of the oxidized glutathione is found.

The variations of the values of the redox-potential and of the oxidized glutathione brought about by the vaccine reaction in the blood of the patients leads us to consider the mechanism of the action of vaccine therapy in typhoid infection, on the same principle described by us regarding the action of penicillin.

Action du succinate de soude sur la respiration

LWOFF, MONOD et BOVER¹ ont récemment signalé que, chez le Chien, les mouvements respiratoires interrompus expérimentalement par l'hyperventilation pulmonaire, reprennent après injection intraveineuse de succinate de soude. DE BOER² a observé que l'administration rapide d'une forte dose de cette substance

¹ A. LWOFF et J. MONOD, C. r. Acad. Sci. 222, 696 (1946).

² B. DE BOER, J. Pharmacol. a. exp. Ther. 88, 366 (1946).