

Summary

Recent experiments carried out in the author's laboratory on the composition and working mechanism of catalases have shown that:

(1) The protein component of blood and liver catalases from horse are identical, as proved by amino acid analyses and immunological tests (R. K. BONNICHSEN).

(2) The biliverdin content of liver catalases is a post-mortem artefact. By using suitable preparative methods BONNICHSEN was able to prepare liver catalases practically free from biliverdin.

(3) The activity values found by the titration method formerly used are too low and uncertain, owing to inactivation of the catalase during the determination. Extrapolation to $t = 0$ does not give correct results. By increasing the catalase concentration and by decreasing the reaction time activity values were obtained which were independent of time, catalase and hydrogen peroxide concentration. The "Kat. F." of all biliverdin-free catalases investigated so far is about 80,000 at 20°, corresponding to an activity constant of $k_1 = 3.5 \cdot 10^7$ Liters $\cdot$ Mol $^{-1}$ $\cdot$ Sec $^{-1}$. Contrary to the results of previous authors no MICHAELIS' constant exists for catalase (BONNICHSEN, CHANCE, and THEORELL).

(4) B. CHANCE, using a highly developed HARTRIDGE-ROUGHTON-MILLIKAN technique ("spectrophotom. with time resolution"), was able to demonstrate the formation of a comparatively stable compound of one mol H_2O_2

with one mol of catalase. Since one catalase molecule contains 4 hematin iron atoms, 3 were left free to combine with ions such as cyanide. The H_2O_2 -catalase has a *peroxidatic* activity towards lower alcohols and ascorbic acid. This finding explains the "coupled oxidations" described by KEILIN and HARTREE.

(5) Alkyl hydroperoxides from compounds with all four catalase hematins (CHANCE). Greenish compounds are formed primarily, red ones secondarily in strict analogy with the horse radish *peroxidase*- H_2O_2 compounds (THEORELL).

(6) Kinetic data were determined for the reactions under (4) and (5).

(7) Catalatic decomposition of H_2O_2 in excess of 1 mol per mol catalase may occur either by the attachment of a second mol of H_2O_2 to a free hematin in catalase- H_2O_2 -complex, or by the reaction of catalase- H_2O_2 with H_2O_2 in some other way, so that O_2 is liberated. No indication of an oxidation-reduction cycle was found.

(8) It is unnecessary to assume that any chain reaction is involved in catalytic decomposition.

(9) If it is assumed that the peroxidatic mode of action of catalases prevails under physiological conditions one can understand (a) why the catalase concentration in many organs is much higher than would be necessary for the decomposition of H_2O_2 ; (b) how Nature avoids the waste of energy that would result from the decomposition of H_2O_2 into oxygen and water.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschließlich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Azione riducente dei raggi X su soluzioni di bleu di metilene¹

Numerose sono le esperienze volte a spiegare il meccanismo attraverso il quale i raggi X esercitano la loro azione chimica e biologica. Ed è incerto il modo onde nell'acqua stessa le radiazioni ionizzanti determinino reazioni chimiche. Tra le principali ricerche ricorderemo quelle di FRICKE² che usò sostanze inorganiche e organiche semplici e quelle di DALE³ che si servì di enzimi. Tutte queste attività delle radiazioni su soluzioni acquose diluite sono *indirette* in quanto le molecole reagenti del soluto non sono state direttamente eccitate o ionizzate dalle radiazioni, come ammette la Treffertheorie o Targettheorie, ma il loro comportamento dipende dall'eccitazione o ionizzazione delle molecole del solvente. WEISS⁴ ha suggerito l'ipotesi che l'acqua at-

tivata dalle radiazioni risulti di radicali H e OH e ricerche probatorie, anzi concludenti, sono state effettuate da FORSSBERG¹ il quale irradiò soluzioni di catalasi.

Noi ci siamo proposti di studiare la riduzione del bleu di metilene attraverso il meccanismo della ionizzazione dell'acqua. A tal fine noi abbiamo dapprima costruito una curva di taratura del bleu di metilene, con lo spettrofotometro di Pulfrich, usando il filtro S. 66,6/3,5. L'estinzione obbedisce alla legge di LAMBERT-BEER e abbiamo calcolato $\lg \alpha = 1,339$. Vorremmo ricordare a questo punto che i potenziali di ossido-riduzione di soluzioni irradiate di bleu di metilene sono stati studiati da LOISELEUR².

Noi abbiamo irradiato in atmosfera d'azoto 10 cm³ di soluzioni n/100000 e n/50000 di bleu di metilene, in provetta in vetro neutro Murano non contenente elementi ad alto peso atomico, come controllammo radiograficamente. L'apparecchio usato era un Gorla-Siama, tubo A.E.G., 120 kV, 3 mA, 40 r/m, D.F. 30 cm, senza filtro³.

¹ A. FORSSBERG, Acta Radiol. 27, 281 (1946); Nature 159, 308 (1947).

² J. LOISELEUR, Bull. Soc. Chim. biol. 25, 21 (1943).

³ Dell'apparecchio concesso a nostra disposizione dall'Istituto di Radiologia dell'Università di Milano andiamo grati al Prof. PERUSSIA.

¹ Desideriamo esprimere la nostra gratitudine alla Dott. MARIA BASSI la cui collaborazione fu preziosa durante lo svolgimento di queste esperienze.

² H. FRICKE, E. J. HART e H. P. SMITH, J. Chem. Phys. 6, 229 (1938).

³ W. M. DALE, Biochem. J. 34, 1367 (1940); Brit. J. Radiol. 16, 171 (1943).

⁴ J. WEISS, Nature 153, 748 (1944).

Il numero delle molecole di bleu di metilene ridotte dopo la somministrazione delle dosi furono le seguenti:

Tabella I

Dose in r	Molecole ridotte/cm ³	Quoziente ionico M/N per paio di ioni
1 200	2,44 · 10 ¹⁴	0,126
3 600	1,38 · 10 ¹⁵	0,238
6 000	2,105 · 10 ¹⁵	0,219
8 300	2,44 · 10 ¹⁵	0,182
10 000	3,09 · 10 ¹⁵	0,192

Poiché si accetta generalmente che 1000 r producono $1,61 \cdot 10^{15}$ paia di ioni per cm³ d'acqua abbiamo dunque potuto calcolare il quoziente ionico (ionic yield). L'irradiazione di una soluzione questa volta alcoolica di bleu di metilene con 10 000 r nelle condizioni sopra descritte non ha esercitato alcuna azione riducente. Abbiamo poi studiato se alcune sostanze aggiunte alle soluzioni acquose potessero determinare un'azione protettiva, come dalle esperienze di FORSSBERG¹ sulla catalasi, concludenti che tale azione è esercitata da sostanze non sature (p. es. acido fumarico e maleico) che reagiscono con i prodotti dell'acqua attivata. Tutte le soluzioni furono irradiate con 10 000 r: non abbiamo potuto studiare l'influenza dell'aggiunta di cisteina perché questa sostanza di per sé è altamente riduttrice del bleu di metilene: i risultati per le sostanze da noi studiate furono i seguenti:

Tabella II

Sostanza	Concentrazione (mM)	Molecole ridotte · 10 ¹⁸	Quoziente ionico M/N per paio di ioni
NaCl isotonico . .	1,45	2,44	0,1515
Acido malonico . .	0,1	1,54	0,0960
Cistina	0,1	0,975	0,0605
Acido succinico . .	0,1	0,81	0,0505
NaCl ipertonico . .	14,5	0,65	0,0404
NaCl ipotonico . .	0,145	0,568	0,0353
Gelatina 1 % . . .	—	0,1625	0,011
Acido fumarico . .	0,1	0,0	0,0

Si può osservare che se l'acido fumarico svolge una azione perfettamente protettiva sulla riduzione del bleu di metilene, tale azione, se pure in grado minore effettuano altresì sostanze sature come l'acido malonico e succinico: perciò il meccanismo di protezione dall'acqua attivata prospettato dal FORSSBERG² non può essere trasferito alla reazione radio-chimica da noi studiata.

E. GALlico e B. CAMERINO

Istituto nazionale per lo studio e la cura dei tumori e Laboratori ricerche Farmitalia, Milano, il 23 dicembre 1947.

Zusammenfassung

Die Verfasser beweisen, daß Röntgenstrahlen eine wässrige, nicht aber eine alkoholische Methylenblaulösung reduzieren. Das spricht für die Theorie der indirekten Wirkung der ionisierenden Strahlung. Als ioni-

sche Ausbeute dieser Versuche wurde etwa 0,2 gefunden. Verschiedene Substanzen (und zwar gesättigte und ungesättigte Verbindungen) schützen in verschiedenem Ausmaß das Methylenblau vor der Wirkung des aktivierten Wassers.

Zur Biogenese des Lignins

(Über das Lignin etiolierter Kartoffelkeimlinge)

Während die Verholzung keimender Pflanzen von botanischer Seite schon mehrfach bearbeitet wurde, liegen darüber noch kaum irgendwelche chemische Befunde vor. Wir haben nun untersucht, ob in der etiolierten, d. h. der im Dunklen unter Ausschluß der Photosynthese keimenden Kartoffelpflanze eine Verholzung sowohl chemisch als auch botanisch nachzuweisen ist. P. KLASON¹ berichtet, daß sich etiolierte Kartoffelkeimlinge botanisch nicht anfärben lassen, aber einen nach Behandlung mit Schwefelsäure unlöslichen, ligninartigen Körper ergeben. Dieser enthält im Gegensatz zum normalen Lignin entweder gar kein oder nur sehr wenig Methoxyl. Daraus schließt er, daß für die Bildung von Methoxylgruppen der bei der Photosynthese entstehende Formaldehyd verantwortlich sei. Eine Nachprüfung dieser Angaben erschien wünschenswert, da man auf diese Art einen guten Einblick in die synthetischen Fähigkeiten der Pflanzenzelle unter Ausschluß des laufenden photosynthetischen Assimilationsvorganges gewinnen kann. Über die Bildung verschiedener anderer Pflanzenstoffe in Etiolements liegen schon einige Untersuchungen vor².

Die wasserleitenden Elemente konnten wir, wie in den nachfolgenden Schnitten gezeigt wird, durch die gebräuchlichen Ligninreagenzien (Phloroglucin-Salzsäure, Anilinsulfat, Reaktion von MÄULE) eindeutig anfärben. Abb. 1 stellt einen Querschnitt und Abb. 2 einen Längsschnitt bei etwa 80facher Vergrößerung dar.

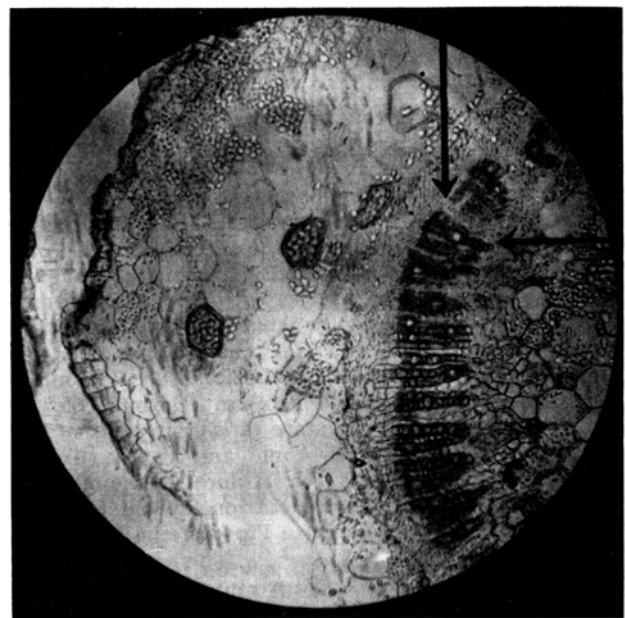


Abb. 1.

¹ A. FORSSBERG, Acta Radiol. 27, 281 (1946); Nature 159, 308 (1947).

² A. FORSSBERG, Acta Radiol. 27, 281 (1946); Nature 159, 308 (1947).

¹ P. KLASON, Cellulosechemie 10, 113 (1932).

² H. K. BARRENSCHEEN, J. PANY und E. SRB, Biochem. Z. 310, 285 (1942).