

Nel mentre i controlli eliminano il 50% dell'acqua somministrata fra i 60 e i 90 min, i ratti iniettati sottocutanea con l'estratto corrispondente a 0,1 g (1), 0,2 g (2), 1 g (3), 3 g (4), 5 g (5) di tessuto salivare eliminano questo 50% solo dopo 90-130 min (1), 120-200 min (2), 200-360 min (3), 300-450 min (4), oltre 500 min (5).

In nessun caso l'effetto antidiuretico fu seguito da poliuria secondaria, almeno nel periodo di tempo, 4-9 ore, per cui è stata protratta l'osservazione.

2.<sup>o</sup> Il principio antidiuretico è stato finora riscontrato solo nelle ghiandole salivari posteriori. Estratti acetonici di intestino, epatopancreas, rene, branchia, testicolo e muscolatura di *Octopus vulgaris* si sono infatti dimostrati privi di qualsiasi azione sulla diuresi, almeno fino a dosi corrispondenti a 1-2 g di tessuto fresco.

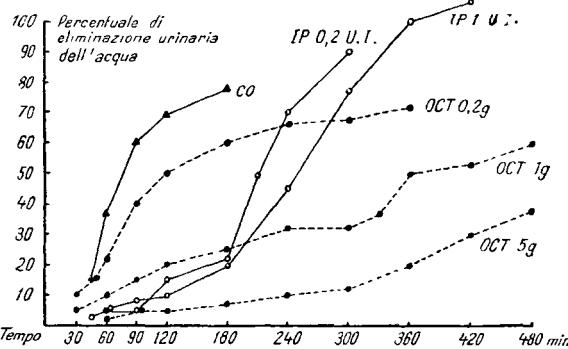
L'azione antidiuretica degli estratti salivari non è imputabile al loro contenuto in sali. Persiste infatti invariata dopo precipitazione della massima parte di questi sali a mezzo di alcool 95%. I sali precipitati non hanno, d'altro canto, alcuna azione sulla diuresi neanche a dosi relativamente elevate (10-50 mg/100 g), corrispondenti a quelle contenute nell'estratto di almeno 1,5-7 g di tessuto salivare fresco.

3.<sup>o</sup> Gli estratti di ghiandola salivare posteriore di *Octopus macropus* hanno costantemente spiegato, al posto dell'azione antidiuretica, una evidente e pronta azione diuretica che forma oggetto di ulteriori nostre ricerche.

4.<sup>o</sup> Il principio antidiuretico salivare presenta una notevolissima termostabilità, non solo in ambiente neutro ma anche in ambiente fortemente acido o alcalino. Dopo trattamento per 1 ora a 100° con NaOH n o con HCl n l'attività antidiuretica permane infatti praticamente invariata. In qualche esperienza si è persino avuta l'impressione di un leggero aumento di attività.

Il principio antidiuretico sembra resistere al trattamento a caldo con iodato di potassio in ambiente lievemente acido (in seguito a questo trattamento gli estratti assumono, per la presenza della sostanza enteraminosimile, un intenso color violaceo, poi violaceo bruno). Esso è totalmente adsorbito da carbone animale a qualsiasi pH.

5.<sup>o</sup> Dal principio antidiuretico dell'ipofisi posteriore quello salivare si distingue già fin d'ora per la sua termostabilità, per la sua azione più protracta e per la mancanza di una poliuria secondaria, facile invece a rilevarsi dopo somministrazione di elevate dosi di preparati ipofisari.



Curve di eliminazione urinaria dell'acqua in gruppi di ratti idratati con somministrazione di acqua per bocca ( $5 \text{ cm}^3/100 \text{ g}$ ) e per via sottocutanea ( $1 \text{ cm}^3/100 \text{ g}$ ).

CO = Controllo (ratti iniettati con acqua distillata).

IP = Ratti iniettati con estratto ipofisario posteriore Upjohn (0,2 e 1 UI).

OCT = Ratti iniettati con estratto acetonico di ghiandola salivare posteriore di *Octopus vulgaris* corrispondente a 0,2, 1 e 5 g di tessuto fresco.

Tutti i valori si intendono per 100 g di ratto.

Prendendo come misura dell'attività antidiuretica di un preparato il ritardo, in confronto ai controlli, nell'eliminazione del 50% dell'acqua somministrata, possiamo dire che l'estratto salivare corrispondente a 0,2-0,4 g di tessuto fresco equivale a circa 1 UI di ipofisi posteriore.

6.<sup>o</sup> Il principio antidiuretico salivare è sicuramente diverso dall'acetilcolina e dalla colina, dalla murexina<sup>1</sup>, dalla tiramina e dall'octopamina<sup>2</sup>, dalla moschatina<sup>3</sup>.

È probabile che esso sia diverso anche dalla sostanza enteraminosimile<sup>2</sup>, ma sull'argomento necessitano ancora ulteriori, più decisive ricerche.

7.<sup>o</sup> Finora il principio antidiuretico salivare è stato sperimentato clinicamente in due casi di diabete insipido. In entrambi si ebbe, per dosi di estratto corrispondenti a 1,5-7 g di tessuto fresco iniettate intramuscolari, una evidente riduzione della poliuria (da 7-8 litri quotidiani a 4-5) e della polidipsia. In paragone con gli estratti di ipofisi posteriore l'azione degli estratti salivari si è rivelata anche nell'uomo diabetico, come già nell'animale normale, notevolmente più duratura.

È la prima volta che nel campo degli Invertebrati viene segnalata la presenza di un principio antidiuretico. Ed è interessante rilevare come questo principio sia localizzato in quelle ghiandole salivari posteriori che, in base alle più ricerche di uno di noi (ERSPAMER), vanno sempre più acquistando la fisionomia di un vero e proprio magazzino di sostanze attive, alcune delle quali verosimilmente di tipo ormonico.

V. ERSPAMER e L. PEROSA

Istituto di Farmacologia dell'Università di Bari, il 1 settembre 1948.

#### Summary

Acetone and alcohol extracts of the posterior salivary glands of *Octopus vulgaris*, *Eledone moschata* and *Eledone Aldrovandi* contain a principle which strongly reduces the diuresis in hydrated rats.

The antidiuretic principle is absent in all other *Octopus* tissues as well as in the salivary glands of *Octopus macropus*.

It shows a high thermostability and is strongly adsorbed by animal charcoal at any reaction.

The salivary antidiuretic substance is not identical with the posterior pituitary principle nor with the other active substances found in the salivary glands of Octopoda.

The injection of salivary extracts satisfactorily reduces polyuria and polydipsia in human diabetes insipidus.

<sup>1</sup> V. ERSPAMER, Exper. 4, 226 (1948).  
<sup>2</sup> V. ERSPAMER, Acta pharmacol. 4, in stampa (1948).  
<sup>3</sup> V. ERSPAMER, Exper. 5, in stampa (1949).

#### Darstellung doppelbrechender Lipoidtropfen aus dem Serum

Nachdem bei der Lipoidnephrose und andern Nierenkrankheiten die Hypercholesterinämie als wichtiges Symptom erkannt wurde, brachte man die Lipoidurie, d.h. das Auftreten doppelbrechender Substanzen im Urin damit in Verbindung und suchte den Durchtritt durch die Niere zu erklären. Daß die Tropfen als solche die Niere, d.h. den Glomerulus passieren können, schien von vorneherein wenig wahrscheinlich. Man dachte deshalb eher an einen Durchtritt durch die Glomeruli in anderer Form, gelöst oder in Verbindung mit Eiweißen als sog. Lipoproteine. Durch Rückresorption in die Tubulusepi-

Patient	Diagnose	Blutcholesterin		Lipoide im Ätherextrakt	Lipoide im Alkoholäther-extrakt
		Gesamt	Ester		
I	Normal . . . . .	204	153	keine	massenhaft
II	Kardiosklerose, Thrombophlebitis, Infarktpneumonie . . . . .	371	283	keine	massenhaft
III	Cholelithiasis . . . . .	384	322	keine	massenhaft
IV	Kardiosklerose, Bronchiektasien, Verdacht auf Amyloidose . . . . .	385	300	keine	massenhaft
V	Diabetes, Glomerulosklerose mit Hypertension . . . . .	333	277	keine	massenhaft
VI	Diabetes mellitus. . . . .	285	219	keine	massenhaft
VII	Arteriosklerose. . . . .	322	294	keine	massenhaft
VIII	Chronische Nephritis mit nephrotischem Einschlag . . . . .	247 312	196 280	keine keine	massenhaft massenhaft

thelien würden diese mit Fetttropfen überladen, es trüten die doppelbrechenden Tropfen darin aus und die Zellen gingen zugrunde, wodurch die Tropfen in den Urin gelangten. Diese Auffassung vertrat vor allem RANDE-RATH<sup>1</sup> auf Grund der Versuche von GÉRARD und CORDIER<sup>2</sup> wie auch von HAVEMANN<sup>3</sup>, die bei Salamandern in den offenen Nephronen eine Rückresorption der in das Coelom injizierten Fettstoffe sahen. BING und STARUP<sup>4</sup> kamen aus Clearanceversuchen zum gleichen Schluß, ebenso GROSS<sup>5</sup>, AMBARD<sup>6</sup> und OERTEL<sup>7</sup> mehr auf Grund klinischer Auffassungen.

Auch ein Durchtreten im tubulären Bereich der Niere kommt aber durchaus in Frage, wobei durch das Zugrundegehen der Epithelien diese Fettstoffe im Proto-plasma in Tropfenform auftreten, ohne daß die Lipoide durch die Glomeruli hindurchgetreten und vom Lumen der Kanälchen her in die Tubulusepithelien rückresorbiert worden sind. Diese Auffassung der Pathogenese der Lipoidurie teilt vor allem MUNK, BENATT und FLOCKENHAUS<sup>8</sup>, weiter auch HAHN und WOLFF<sup>9</sup>, BÜRG-GER<sup>10</sup>, GAÁL<sup>11</sup> und SCHALLY<sup>12</sup>.

Unter Lipoidurie verstehen wir hier in dieser Arbeit das Auftreten von doppelbrechenden Substanzen im Urin. Die Ausscheidung solcher geht wahrscheinlich mit der chemischen Cholesterin- und Phosphatidurie nicht parallel.

Weder in normalem noch in Blut von Kranken mit einer Lipoidnephrose konnten bisher mikroskopisch doppelbrechende Lipoidtropfen nachgewiesen werden. Auch bei stark milchig getrübten Seren ist das nicht der Fall, und es findet auch kein Aufrahmen statt (VOLHARD<sup>13</sup>).

<sup>1</sup> E. RANDERATH, Klin. Wschr. 20, 281, 305 (1941).

<sup>2</sup> P. GÉRARD, C. r. Soc. biol. Paris 70, 998 (1911). — P. GÉRARD und R. CORDIER, C. r. Soc. biol. Paris 115, 199 (1934); Arch. int. Med. exp. 8, 225 (1933).

<sup>3</sup> HAVEMANN, cit. nach RANDERATH.

<sup>4</sup> J. BING, *Studies on Proteinuria* (Diss., Copenhagen 1936). — J. BING und V. STARUP, Acta med. Scand. 86, 12 (1935).

<sup>5</sup> O. GROSS, Dtsch. Arch. klin. Med. 133, 9 (1920); Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 33, 343 (1921).

<sup>6</sup> L. AMBARD, Arch. Mal. Reins 10, 545 (1936); ref. Zentr. Bl. inn. Med. 93, 192 (1938).

<sup>7</sup> E. OERTEL, Dtsch. Arch. klin. Med. 185, 357 (1940).

<sup>8</sup> F. MUNK, *Pathologie und Klinik der Nierenkrankheiten* (Berlin 1918). — F. MUNK, A. BENATT und M. FLOCKENHAUS, Klin. Wschr. 4, 863 (1925).

<sup>9</sup> A. HAHN und E. WÖLFF, Z. klin. Med. 92, 393 (1921).

<sup>10</sup> M. BÜRG-GER, Erg. inn. Med. 34, 583 (1928).

<sup>11</sup> A. M. GAÁL, Z. ges. exp. Med. 71, 690 (1930).

<sup>12</sup> A. O. SCHALLY, Erg. inn. Med. 50, 480 (1936).

<sup>13</sup> F. VOLHARD, *Bright'sche Nierenkrankheit* (Berlin 1914).

Die Annahme einer bloßen Emulgierung des Fettes im Serum ist wenig wahrscheinlich, weshalb man eher an eine Veränderung der gesamten kolloidalen Struktur glaubte, was durch die veränderten Bluteiweißwerte und andere Befunde gestützt wird. WEIL<sup>1</sup> und BERNERT<sup>2</sup> nahmen Veränderungen der Serumglobuline an, aber wahrscheinlich betrifft es nicht nur diese Fraktion der Serum eiweiße.

Die Lipoproteine, d.h. Verbindungen physikalischer oder chemischer Natur zwischen Eiweißen einerseits und Fett, Cholesterin oder Phosphatiden andererseits sind schon lange bekannt. Die Fette wie auch das Cholesterin und zum Teil die Phosphatide lassen sich ja in einer wäßrigen Lösung, wie es das Serum darstellt, nicht lösen und wir müssen deshalb annehmen, daß alle diese Substanzen irgendwie gebunden im Blutserum vorhanden sind. Diese Bindung besteht hauptsächlich an Eiweiße. Durch die Ätherextraktion wird nur ein Teil dieser Lipoide aus ihren Bindungen mit dem Eiweiß abgespalten. Es handelt sich hier offenbar um lockere Bindungen, während die festeren dieser Ätherextraktion widerstehen. Um eine völlige Extraktion zu erreichen, muß das Serum mit einer Mischung von Äther und Alkohol 1:3 behandelt werden. Dabei werden offenbar alle Verbindungen zwischen Fett und Eiweiß gelöst und das Eiweiß selbst wird gefällt.

Zuerst wurde die Frage, ob solche doppelbrechende Lipoide, wie sie im Urin vorkommen, aus dem Blute darstellbar seien, angegangen. Wir bedienten uns dabei folgender Methodik:

Normales oder pathologisches Serum wurde mit einem Überschuß von Äther während einer Stunde in der Schüttelmaschine extrahiert. Dann wurde der überstehende Äther dekantiert und eingedampft, wobei fast zuletzt etwa 2–3 Tropfen destilliertes Wassers beigegeben wurden, damit sich die im Äther gelösten Fette und Lipoide nach Abdampfen des Äthers in Tropfenform im Wasser emulgieren. Von den gleichen Sera wurde in einem Parallelversuch eine Menge von 3–5 cm<sup>3</sup> mit einem großen Überschuß von Ätheralkohol unter Aufkochen nach der Methode von BLOOR<sup>3</sup> extrahiert, filtriert, und dieser Alkoholäther wiederum unter Zugabe von einigen Tropfen Wasser auf die gleiche Weise eingedampft wie der Ätherextrakt. Der Rückstand, der in einigen Tropfen Wasser alle extrahierten Fettstoffe in Tropfenform enthält, wurde mikroskopisch auf doppelbrechende Lipoide untersucht.

Daraus ergibt sich, daß bei normalen wie bei pathologischen Seren durch Alkoholätherextraktion sich stets doppelbrechende Lipoidtropfen darstellen lassen, jedoch

<sup>1</sup> F. WEIL, Münchener med. Wschr. 59, 2096 (1912).

<sup>2</sup> R. BERNERT, Arch. exp. Path. Pharm. 49, 32 (1903).

<sup>3</sup> W. R. BLOOR, *Biochemistry of the fatty acids and their compound, the lipids* (New York, 1943).

nicht mit der Ätherextraktion allein. Wir schließen also daraus, daß bei der Ätherextraktion wohl Fette aus dem Serum abgespalten werden, jedoch keine mit Doppelbrechung, und daß die doppelbrechenden Substanzen fester an Eiweiß gebunden sind und erst durch eine völlige Denaturierung des Eiweißes durch Alkohol abgespalten werden.

Es hat sich bei andern Versuchen ergeben, daß sich die doppelbrechenden Tropfen nur dann gut darstellen lassen, wenn sie aus Alkoholäther, nicht aber aus Äther allein durch Abdampfen ausgefällt werden. Wenn man sicher lipoidhaltiges Material in Äther auflöst und diesen Äther wieder abdampft, so erhalten wir keine oder nur wenige doppelbrechende Tropfen, wohl aber sehr viele Tropfen, wenn sie aus Alkohol (oder aus Ätheralkohol, wobei der Äther zuerst abdampft) ausgefällt werden.

Der vorangehende Versuch wurde deshalb nochmals kontrolliert, indem zum Ätherextrakt nach Trennen vom Serum noch Alkohol beigegeben wurde. Das negative Resultat änderte sich indessen aber nicht.

Zur Veranschaulichung der letzteren Beobachtung erwähnen wir folgenden Versuch:

Etwa 100 cm<sup>3</sup> Serum wurden mit 500 cm<sup>3</sup> Ätheralkohol unter Aufkochen ausgezogen und filtriert:

1. Von diesem Extrakt A wurden 100 cm<sup>3</sup> nach der üblichen Weise eingedampft und mikroskopisch untersucht: massenhaft Lipoidtropfen.

2. Weitere 100 cm<sup>3</sup> des Extraktes A wurden eingedampft, dann mit heißem Petroläther zur Abtrennung der Salze und des Zuckers ausgezogen und wiederum mit einigen Tropfen Wasser aus dem Petroläther eingedampft: ganz vereinzelt Lipoide. Wurde jedoch dieses untersuchte Material nochmals in Ätheralkohol gelöst und wieder eingedampft: massenhaft Lipoidtropfen sichtbar.

3. 100 cm<sup>3</sup> von A wurden völlig eingedampft, mit Chloroform ausgezogen und die Lipoide aus dem Chloroform gefällt: einzelne Lipoidtropfen. Wurde aber der Extrakt wieder in Ätheralkohol gelöst und eingedampft: massenhaft Lipoidtropfen.

4. 100 cm<sup>3</sup> von A eingedampft, mit Petroläther ausgezogen, auf etwa 6 cm<sup>3</sup> eingeengt und zur Fällung der Phosphatide 14 cm<sup>3</sup> Aceton und 6 Tropfen Magnesiumchlorid zugesetzt, zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit, die die Neutralfette und das Cholesterin enthält, eingedampft: keine Lipoide. Wieder in Ätheralkohol gelöst und nochmals eingedampft: massenhaft Lipoidtropfen.

5. Nach dem Zentrifugieren bei der Zubereitung des vorigen Extraktes (4) blieb ein Satz zurück (Phosphatide), der nun mit feuchtem Äther gelöst und wieder eingedampft wird: keine Lipoidtropfen. Auch nach Lösung in Ätheralkohol und nochmaligem Eindampfen negativ.

Wir sehen aus diesen Versuchen, daß sich doppelbrechende Substanzen also *in vitro* nur bei der Ausfällung aus Ätheralkohol oder Alkohol nachweisen lassen, nicht aber oder nur spärlich bei der Ausfällung aus Petroläther, Chloroform, Aceton oder Äther. Zugleich erkennen wir, daß überall dort doppelbrechende Substanzen nachweisbar waren, wo die Cholesterinfraktion noch enthalten war. Die Phosphatide allein zeigten keine Doppelbrechung. Dieses Resultat unserer Untersuchungen deckt sich mit demjenigen von KAWAMURA<sup>1</sup>. Bei den doppelbrechenden Substanzen handelt es sich in erster Linie um Cholesterinester.

R. CAVELTI

Medizinische Klinik der Universität Bern, den 8. Juni 1948.

#### Summary

(1) Doubly refracting lipoid droplets can be demonstrated in normal and pathological sera by means of alcohol ether extraction. This is not possible with ether extraction alone.

(2) These lipoid droplets can be demonstrated only, or almost only, when they are precipitated out of alcohol or ether alcohol.

<sup>1</sup> R. KAWAMURA, *Die Cholesterinesterverfettung* (Jena 1911).

#### Darstellbarkeit doppelbrechender Lipoidtropfen aus dem Urin und pathogenetische Auffassungen der Lipoidurie

In der ersten Mitteilung wurde festgestellt, daß sich aus normalen wie aus pathologischen Seren mittels der Alkoholätherextraktion immer doppelbrechende Lipoidtropfen nachweisen lassen. Nun interessiert uns die Frage, ob sich aus dem Urineiweiß auch solche Tropfen darstellen lassen.

Zu diesem Zwecke wurden eiweißhaltige Urine einerseits mit Äther, andererseits mit Alkoholäther mit der gleichen Methodik wie beim Serum extrahiert. Da die Konzentration des Eiweißes im Urin fast immer wesentlich geringer ist als im Serum, mußte bedeutend mehr Urin angesetzt werden: pro Versuch 100 bis 400 cm<sup>3</sup>. Das Eindampfen der großen Mengen bei der Alkoholätherextraktion geschah im Wasserbad unter Vakuum. Da die großen Salzmengen bei der mikroskopischen Untersuchung stark störend wirkten, wurde bei den meisten Versuchen bei der Alkoholätherextraktion die Fettfraktion durch Ausziehen mit heißem Petroläther von den Salzen getrennt, der Petroläther eingedampft und die Fette wieder in Ätheralkohol gelöst. Bei der Extraktion mit Äther allein wurde nach Abtrennen vom Serum Alkohol hinzugegeben (Tab. I).

Teilweise wurde auch eine andere Methodik angewendet: Aus großen Mengen Urin (800 cm<sup>3</sup>) wurde zuerst das Urineiweiß entweder mit Essigsäure und Kochen, mit Esbach-Reagens oder auch mit Natriumwolframat und Schwefelsäure gefällt. Dieses Eiweiß wurde durch Zentrifugieren von der Flüssigkeit getrennt und beide für sich mit der vorangehenden Methode untersucht (Tab. II).

Bei den Patienten VIII und XI wurden bei der gewöhnlichen Sedimentuntersuchung mit den Nicolschen Prismen mehrmals Lipoidtropfen nachgewiesen. Es handelt sich dabei also um eine klinisch nachweisbare Lipoidurie.

Wir sehen aus diesen Versuchen, daß auch bei teilweise sehr großer Urineiweißausscheidung keine oder nur ganz vereinzelte Lipoidtropfen nachzuweisen waren. Wenn wir die große Urinmenge, die wir zur Extraktion verwendeten, in Berücksichtigung ziehen, so sind diese vereinzelten Tropfen im Konzentrat in quantitativer Hinsicht zu vernachlässigen. Zum Beispiel hat es in einer Urinmenge von 800 cm<sup>3</sup> bei 5% Eiweißgehalt 4 g Eiweiß, wobei keine oder nur ganz vereinzelte Tropfen im Extrakt gefunden werden konnten, während in 3 cm<sup>3</sup> Serum bei 7% Eiweißgehalt nur 0,21 g Eiweiß enthalten sind, wir aber im Extrakt das ganze Gesichtsfeld mit doppelbrechenden Tropfen völlig übersät haben.

Das Auftreten von einzelnen doppelbrechenden Substanzen bei der Extraktion erklärt sich wohl am einfachsten dadurch, daß diese Cholesterinester aus den Lipoproteinen der Leukozyten und Epithelien, die in diesen pathologischen Urinen in verschieden großer Menge stets vorhanden waren, stammen. Weiter ist zu berücksichtigen, daß diese vereinzelten Tropfen sich fast nur bei der Patientin VIII fanden, die schon klinisch eine Lipoidurie zeigte.

Man kann übrigens, um die obenerwähnte Herkunft aus dem zelligen Material zu belegen, bei der Extraktion von Organen, die von ausgebluteten Tieren stammen, leicht beweisen, daß das Gewebe und wahrscheinlich jede Körperzelle solche doppelbrechende Lipoide am ehesten in der Form der Lipoproteine besitzt. Um sichtbar zu werden, müssen die Lipoide nur vom Eiweiß irgendwie getrennt werden.

Wir haben eine Ätheralkoholextraktion an gesunder Kanincheneleber, -niere und -milz nach Zerreissen mit Sand durchgeführt und erhielten dabei aus allen Organen ganz massenhaft doppelbrechende Tropfen. Wir glauben also, daß bei dem durch die Glomeruli durchgetretenen Eiweiß sich offenbar keine Lipoproteine befinden, die als Fettanteil Lipoide von doppelbrechendem Charakter tragen. Wenn tatsächlich solche Lipoproteine durchtreten und von den Tubuli wieder aufgenommen