

Connecticut, von theophyllinfreiem Salyrgan den Höchster Farbenwerken und von Stickstoffloft der Fa. Ciba, Wehr i. Baden verbindlichst zu danken.

G. KUSCHINSKY und F. TURBA

Pharmakologisches Institut der Universität Mainz, den 15. Oktober 1949.

Summary

(1) By means of a simple method the conditions were investigated for contraction and relaxation of actomyosin (AM) under the influence of potassium, magnesium, and calcium ions, of adenosintriphosphate (ATP) or muscledenylic-acid and phosphocreatin.

(2) Raising the calcium chloride concentration to 0.2 m and raising the p_H from 6.9 to 7.3 hinders the contraction of actomyosin by ATP; in uncontracted AM-gel, ATP leads to a relaxation under these conditions.

(3) Relaxation of the contracted gel can be brought about by dissolving in potassium chloride and precipitating by dilution: calcium furthers this relaxation; afterward ATP leads again to a contraction.

(4) Reminders of ATP from the first contraction lead in this stage again to a partially contracted gel; phosphocreatin reinforces this effect.

(5) Certain SH-groups and amino groups, but not carboxyl groups, are involved in the production of the contraction.

(6) SH- and amino groups are also necessary for the ATP-ase effect. The relation of actomyosin-ATP-ase to contraction, of myosin-ATP-ase to relaxation is pointed out.

sondern auch durch andere «thioloprive» Substanzen gehemmt wurde. Allerdings wählten sie für das Studium dieser Frage Froschmuskelsextrakt (Verdünnung 1:66), der 1% Glukose und außerdem die fraglichen Hemmsubstanzen enthielt. Nach MEYERHOF¹ ist aber die Milchsäurebildung aus Glukose in solchen Extrakten ohne Zusatz von Aktivatoren minimal. Die Milchsäure bestimmten die genannten Autoren nach 24 und 48 Stunden Inkubation – sie fanden noch am zweiten Tage erhebliche Milchsäurebildung.

Diese an Extrakten gewonnenen Ergebnisse auf die Verhältnisse im arbeitenden Muskel zu übertragen, schien mir gewagt. Es wurde daher versucht, die Hemmung der Milchsäurebildung nach einer Durchströmung mit den betreffenden Substanzen auch am unversehrten Muskel nachzuweisen.

Die Hinterextremitäten eben getöteter Sommerfrösche (*R. temporaria*) wurden von der Aorta her 2 Minuten lang mit Lösungen der «thiolopriven» und anderer kontrakturerregender Substanzen durchströmt. Die Technik entsprach der von LÄWEN² und TRENDLENBURG³ angegebenen. Nach der Durchströmung wurde die Hinterextremität sofort mit Öffnungsinduktionsstrom 10 Minuten lang gereizt. Die Muskeln gingen dabei in Starre über. Dann wurde die Muskulatur rasch abgeschnitten und bis zur Weiterverarbeitung in flüssiger Luft aufbewahrt. Nach genauer Wägung wurde etwa 1 g derselben im vorgekühlten Mörtel mit Glaspulver zu homogenem Brei verrieben, nach SCHENK enteiweißt, der vorhandene Zucker mit Kupfer/Kalk-Fällung entfernt und endlich die Milchsäure nach LIEB und ZACHERL⁴ bestimmt.

In der Erwartung, daß sich die von BACQ angegebenen Substanzen ähnlich verhalten würden wie die Monojodessigsäure, wurden noch Pharmaka untersucht, von denen eine Reaktion mit SH-Gruppen nicht anzunehmen ist. Coffein und Chloroform schienen geeignet, da sie unter den angeführten Bedingungen ebenfalls eine Muskelstarre hervorrufen. Von den sogenannten «thiolopriven» Substanzen wurden Chlorkiprin, Sublimat, Allylsenföhl und Chloraceton ausgewählt. Als Vergleichsobjekt diente Monojodessigsäure. Die Konzentrationen der Durchströmungslösungen genügten in jedem Falle, eine Kontraktion der Muskeln auszulösen. Alle Lösungen waren mit Froschringer angesetzt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt, jeder Milchsäurewert bedeutet darin einen Einzelversuch:

2 Min. durchströmt mit	Elektr. Reizung	Milchsäure in mg%			
Ringerlösung allein	ungereizt	67	75	88	48
Ringerlösung allein	10'	214	184	201	190
Monojodessigsäure 3 ⁰ / ₁₀₀	10'	42	51	36	56
Allylsenföhl 2 ⁰ / ₁₀₀	10'	186	205	198	184
Chloraceton 1 ⁰ / ₁₀₀	10'	196	179	188	210
Chloroform 1 ⁰ / ₁₀₀	10'	172	195	138	194
Coffein 1 ⁰ / ₁₀₀	10'	229	212	192	209
Sublimat 1 ⁰ / ₁₀₀	10'	137	146	170	153
Chlorkiprin 1 ⁰ / ₁₀₀	10'	277	223	245	234

Die aufgeführten Werte für die ungereizte, mit Ringerlösung durchströmte Muskulatur sind von der gleichen

Über Milchsäurebildung im Froschmuskel nach Einwirkung einiger krampferzeugender Substanzen

Vor einiger Zeit hat BACQ in dieser Zeitschrift¹ eine Hypothese mitgeteilt, worin er die Giftwirkung von Oxydationsmitteln, Schwermetallsalzen und einigen halogensubstituierten organischen Verbindungen auf einen gemeinsamen Wirkungsmechanismus zurückführt. Nach dieser Theorie hemmen alle genannten Substanzen die enzymatischen Vorgänge der Zelle durch Dehydrierung der im Eiweiß und den Peptiden vorhandenen SH-Gruppen. BACQ nannte sie daher «thioloprive Substanzen». Schon früher war bekannt, daß solche Verbindungen chemisch mit SH-Gruppen reagieren können. BACQ und Mitarbeiter¹ stellten außerdem fest, daß ihre pharmakologischen Eigenschaften eine so weitgehende Ähnlichkeit aufwiesen, daß ihnen der Schluß auf einen gleichartigen Wirkungsmechanismus berechtigt schien. Von diesen Eigenschaften beschäftigt uns hier nur der sogenannte «Lundsgaard-Effekt», den die «thiolopriven» Substanzen hervorrufen sollen. Nach BACQ² handelt es sich dabei um den gleichen Vorgang, den LUNDGAARD³ bei der Vergiftung mit Monojodessigsäure beobachten konnte. Seine Merkmale bestehen im Auftreten eines Muskelkrampfes erst nach Arbeitsleistung, völliger Hemmung der Milchsäurebildung unter gleichzeitigem Phosphagenzerfall und Veresterung des frei werdenden Phosphats mit Hexosen. Dementsprechend fanden BACQ und ANGENOT⁴, daß die Milchsäurebildung in Froschmuskulatur nicht nur durch Monojodessigsäure,

¹ O. MEYERHOF, Biochem. Z. 178, 462 (1926) und ebendort 183, 176 (1927).
² A. LÄWEN, A. e. Phk. 51, 415 (1904).
³ P. TRENDLENBURG, Arch. ext. Pharm. 63, 161 (1910).
⁴ H. LIEB und M. K. ZACHERL, Z. physiol. Chem. 211, 211 (1932).

¹ Z. M. BACQ, Exper. 2, 349 (1946).
² Z. M. BACQ, Bull. Acad. Roy. Med. Belg. 2, 108 (1942).
³ E. LUNDGAARD, Biochem. Z. 217, 162 (1930).
⁴ Z. M. BACQ und P. ANGENOT, C. r. Soc. biol. Paris 134, 105 (1940).

Größenordnung, wie sie auch von andern Autoren gefunden wurden. Nach Arbeitsleistung wird das Drei- bis Vierfache an Milchsäure gebildet, während die durch Monojodessigsäure vergiftete Muskulatur auch dann eher weniger Milchsäure aufweist als die ruhende. Bei allen andern Vergiftungsarten konnte ein ähnlicher Effekt nirgends festgestellt werden. Behandlung mit Chlorpikrin und Coffein bewirkten sogar eine geringe Steigerung der Milchsäurebildung. Die niedrigeren Werte nach der Durchströmung mit Sublimat dürften wohl auf die dabei eintretende ödematöse Quellung des Muskelgewebes zurückzuführen sein, die größeren Wassergehalt mit sich bringt und dadurch geringere Milchsäurekonzentration vortäuscht. Mit Sublimat durchströmte Muskeln enthalten bis zu 18% weniger Trockensubstanz (bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet) als die gleiche Menge mit Ringerlösung durchströmter Muskulatur.

BECK und BEIN¹ haben kürzlich am Frostmuskel untersucht, ob die durch Monojodessigsäure hervorgerufene Muskelstarre mit der durch andere «thioloprive» Substanzen erzeugten identisch ist. Sie fanden zwar formale Ähnlichkeit aller vom erstarrten Muskel geschriebenen Kurven, konnten aber die für die Monojodessigsäurevergiftung typische Veränderung in den Fraktionen der Hexosephosphorsäureester (Lohmannsche Hydrolysekurven) nirgends sonst nachweisen. Es muß also daran festgehalten werden, daß allein die Monojodessigsäure fähig ist, die Milchsäurebildung zu unterdrücken und die Veresterung des Phosphats in andere Bahnen zu lenken. Die sonst untersuchten «thiolopriven» Substanzen besitzen dagegen diese Fähigkeit nicht, die Muskelstarre, die nach Behandlung mit denselben eintritt, darf dem Lundsgaard-Effekt nicht gleichgesetzt werden.

RUDOLF KRUEGER²

Aus der Pharmakologischen Anstalt der Universität Basel, den 1. Dezember 1949.

Summary

Intact frog muscles were perfused with solutions of iodoacetate, allylisothiocyanate, chloroacetone, chloroform, caffeine, mercuric chloride, and chloropicrin. They were made to contract by work and their lactic acid content was determined afterwards. Only iodoacetate inhibited the expected accumulation of lactate in the working muscle. The other investigated substances allowed normal production of lactic acid. Chloropicrin and caffeine caused a small increase. Iodoacetate alone inhibits the production of a true Lundsgaard effect.

¹ G.E. BECK und H. J. BEIN, *Helv. physiol. acta* 6, 398 (1948).

² Jetzige Adresse: *Physiol.-chem. Institut der Universität Basel.*

Die Wirkung von Blutserumfraktionen auf die Wanderung menschlicher Leukozyten *in vitro*

Im Zitratplasma, das durch Rekalzifizierung mit isotonischem CaCl_2 (1,29%) zum Gerinnen gebracht wird, ist die Wanderung menschlicher Leukozyten gering. Fügt man neben dem Kalziumchlorid noch etwas natives Serum zu, so wird die Leukozytenwanderung stark gesteigert (ALLGÖWER¹).

Das führt zur Fragestellung, welche Serumstoffe außer dem Kalzium für die Leukozytenbewegung von besonderer Bedeutung sind.

Wir haben vorerst die Serumproteine in eine hauptsächlich die γ -Globuline enthaltende Fraktion und in die verbleibende Fraktion der «Rest-Proteine» aufgeteilt. Über den Einfluß dieser beiden Fraktionen auf die Leukozytenwanderung wird hier kurz berichtet.

Technik

Leukozytenwanderung. Wir bedienen uns dabei der früher beschriebenen Technik der Auswanderung der Leukozyten aus einem Leukozytenfilm, der in kleine Stücke geschnitten wird. Die Auswanderung erfolgt im Zitratplasma, das durch Rekalzifizieren zum Gerinnen gebracht wird. Fördernde Einflüsse kommen am besten zum Ausdruck, wenn man Leukozyten gesunder Individuen mit 4–8000 Zellen pro cm^3 verwendet. Die notwendige Dicke des Leukozytenfilms von ca. 0,5 mm kann durch Anreichern der Leukozyten erhalten werden. Wir haben die Leukozytenbewegung nach drei Kriterien beurteilt: 1. *Zurückgelegter Weg:* Einen guten Ausdruck dafür stellt die im Plasmakoagulum erhaltene Auswanderungsfläche dar. 2. *Wanderungsgeschwindigkeit:* Diese wurde untersucht mit Hilfe von Zeitrasterfilmen. 3. *Chemotaxis:* Die zu untersuchende Fraktion wurde lokal aufgebracht und beobachtet, ob eine einseitige Wanderung der Leukozyten auftrat.

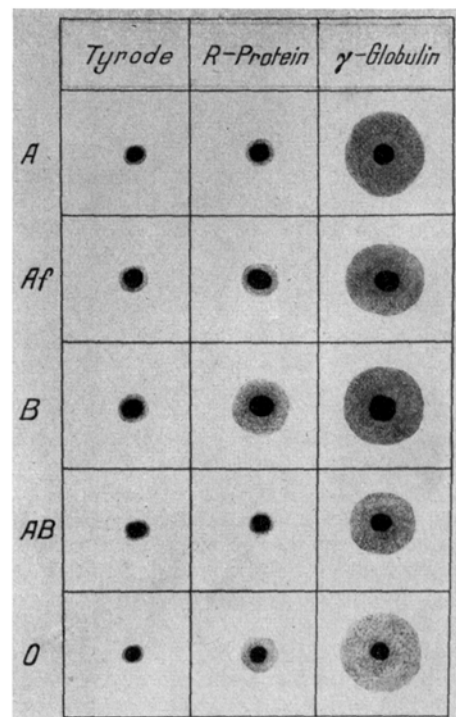


Abb. 1. Leukozytenwanderung unter dem Einfluß von « γ -Globulin» bzw. «Rest-Proteinen» aus 5 verschiedenen Seren. A Serumfraktion des Leukozytenspenders, Af, B, AB, O Serumfraktionen von Spendern mit verschiedenen Blutgruppen. Tyrodezusatz: Kontrollen.

Serumfraktionierung. Um die γ -Globuline von der Hauptmenge der übrigen Serumproteine abzutrennen, wurde dem Serum $\frac{1}{2}$ seines Volumens gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugesetzt. Die Mischung wurde 12–16 Stunden lang bei 4° C gehalten. Die Fällung wurde abzentrifugiert, 2mal mit $\frac{1}{2}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen, in Tyrode gelöst und 20–36 Stunden lang bei 4° C gegen häufig erneuerte Tyrode dialysiert (= « γ -Globulin»). Die nach der Abtrennung der « γ -Globulin»-Fraktion erhaltene Eiweißlösung wurde in der gleichen Weise gegen Tyrode dialysiert (= «Rest-Proteine»). Nach der Dialyse wurde in den Lösungen die Eiweißmenge bestimmt, durch Verdünnen mit Tyrode wurden die Proben jeder Versuchsreihe auf den gleichen Eiweißgehalt gebracht, der in den verschiedenen Versuchen zwischen 0,8 und 1,5% lag. Die auf die Leukozyten einwirkende Konzentration der Fraktionen war zwischen 0,2 bis 0,4%.

¹ M. ALLGÖWER, *Exper.* 5, 405 (1949).