

lendlamin, d. h. 85–90 % Äthylendiaminsulfat enthaltend) angewendet, also 1:15 000 bis 25 000 Cu (1:3750–6250 CuSO₄ · 5H₂O) und 1:2200–2300 Äthylendiamin-Sulfonamid. Es zeigte sich gar keine oder nur kaum wahrnehmbare fungistatische Wirkung, so daß unzweifelhaft eine ausgesprochen synergistische Wirkung der Komponenten in den Kupfer-Äthylendiaminsulfonamid-Komplexen vorhanden ist. – Die große Differenz der 2 *Nocardia*-Stämme gegen den Sulfathiazolkomplex ermöglicht eine Differenzierung der genannten Spezies.

Auf Grund der vielversprechenden *in-vitro*-Versuche sind Toxizitätsbestimmungen sowie Untersuchungen über die Ausscheidung und Akkumulation in den verschiedenen Organen und Drüsen in unserem Laboratorium sowie über eine mögliche bakteriostatische und bakterizide Wirkung der neuen Komplexe, im Gange. Hierüber werden wir später berichten.

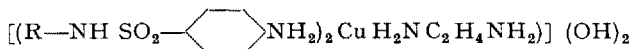
JOSÉ ERDOS

Forschungslaboratorium für organische Chemie der Technischen Hochschule Mexico, D. F., den 30. Januar 1950.

Summary

Preparation of new complexes of sulfas with ethylenediamine and Cu, Zn, Co and Ni in general: 1 mol of MeOH freshly precipitated and very well washed is dissolved in 2 or more mol of ethylenediamine monohydrate, 1–2 mol of sulfas is to be added, it is filtered, and the liquid is precipitated and washed with ethyl alcohol and ethyl alcohol-ether. Dried in vacuum.

Physical characteristics of the new complexes and the formula proposed for some containing copper, based on analytical data, are reported:



In the midst of Saboureaud and at normal temperature the following fungi are inoculated: *Candida albicans* (of spittle). *Epidermophyton floccosum*. *Hormodendrum podrosi*. *Blastomyces dermatitidis*. *Cryptococcus neoformans*. *Nocardia brasiliensis* (of the micetoma abdomen, of the thorax and musculature). *Nocardia asteroides*. Cupric complexes of the following sulfas were added: Thiazol, Phtalyl-Thiazol, Succinyl-Thiazol, Acethyl-Sulfanylamid, Meracin, Methyl-Thiazol, Diacin, Piridin, Sulfanylamid in proportion of 1:2,000; 1:5,000; 1:10,000; 1:20,000; 1:50,000; 1:100,000, and 1:150,000. L. F. BOJALIL J. determined inhibition by means of the technique of A. GONZALEZ OCHOA y ZOZAYA J. (The square of the diameter of the colonies is graphically represented as the ordinate, and the days of observation as the abscissa.)

Candida albicans, *Epidermophyton floccosum*, and *Cryptococcus neoformans* do not inhibit in the greatest concentration. *Blastomyces dermatitidis* inhibition with all complexes at 1:2,000, with Sulphameracin also at 1:5,000.—*Hormodendrum podrosi*: with Sulfanylamid inhibition in dilution of 1:10,000, with Diacin, Piridin, and Thiazol in 1:5,000, with the others not even in 1:2,000.—*Nocardia brasiliensis*: inhibition with Thiazol 1:150,000, Meracin 1:50,000; with the rest—except Succinyl-Thiazol and Acethylsulfanylamid complex—in concentrations of 1:20,000.—*Nocardia asteroides* is far more resistant: with Thiazol 1:100,000 inhibition has not been observed. Upon control with CuSO₄ · 5H₂O and sulfas with ethylenediamine corresponding to the highest concentration used (1:2,000=Cu 1:15,000—25,000) there was no noticeable inhibition in any of the fungi employed.

Veränderungen der Retikulozytenzahl in unmittelbarem Anschluß an experimentell erzeugten Sauerstoffmangel¹

Eine Verminderung der Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut übt einen starken Reiz auf die blutbildenden Organe aus. Dies hat seinerzeit MIESCHER² und seine Schule nachgewiesen. Aber die physiologischen Reize sind verschiedener Art. Der Natur der «Hämatopoietine», deren Begriff seinerzeit von CARNOT und DEFLANDRE³ aufgestellt wurde, werden bis in jüngster Zeit sorgfältige Untersuchungen gewidmet, unter denen diejenigen von v. BONNSDORF und JALAVISTO⁴ erwähnt sein mögen.

Falls die erythropoietische Funktion des Knochenmarks nicht durch andere Einflüsse gestört wird, gibt sich seine erhöhte Tätigkeit durch eine Steigerung der Anzahl Retikulozyten im peripheren Blut zu erkennen. Dies tritt u. a. auf bei Übergang aus dem Tiefland in ein Höhenklima. Die Retikulozytose erreicht dabei gewöhnlich ihren höchsten Wert 3–7 Tage nach der Veränderung der Atmungsbedingungen. Aber auch in unmittelbarem Anschluß an gewisse Eingriffe (Ventrikulographie, Subokzipitalpunktion) und im Zusammenhang mit stark ermüdenden körperlichen Anstrengungen ist eine kurzdauernde, bedeutende Vermehrung der Retikulozyten nachgewiesen worden. Es wird allerdings behauptet, daß eine derartige Retikulozytenausschwemmung, wenn von kurzer Dauer und ohne gleichzeitig nachweisliche Linksverschiebung, ausschließlich eine Emission bereitstehender reifer Zellen sein soll, und deshalb nicht als ein Zeichen einer erhöhten Markfunktion aufgefaßt werden kann.

Für die nachfolgenden Hypoxie- und Ergometrie-Versuche ist ein modifiziertes Knippingsches Spirometer verwendet worden; Analyse der Luft im geschlossenen System vor und nach dem Versuch mit dem Haldaneschen Apparat. Die Arbeit wurde mittels Kurbeln ausgeführt und das Resultat direkt in Watt abgelesen⁵. Die Blutuntersuchungen wurden unmittelbar vor dem Versuch, sowie während der 2 darauffolgenden Stunden vorgenommen. Im Laufe des Hypoxieversuches wurde außerdem das Blut nach 10 Minuten und nach 20 Minuten, vor Entfernung der Maske, untersucht. Nach der Ergometrie fanden die ersten Untersuchungen nach 10 Minuten statt. (Zählung der Erythrozyten. Färbung der Retikulozyten mit Brillantkresylblau; Nachfärbung mit Giemsa. Die Anzahl Retikulozyten auf wenigstens 2000 Erythrozyten gerechnet; Resultat pro Mille und in Gesamtanzahl pro mm³ angegeben.)

Hypoxieversuche von kurzer Dauer wurden 8mal an 7 Versuchspersonen vorgenommen. In 3 Fällen dauerte der Versuch 20 Minuten; Sauerstoffgehalt der einzuatmenden Luft zwischen 11,5 und 13,0%. In 3 Fällen, Versuchsdauer 10 Minuten, Sauerstoffkonzentration zwischen 9,3% und 11,0%. In 1 letzten Fall wurde der Hypoxieversuch wegen Kollapssymptomen nach 4 Minuten unterbrochen. Sauerstoffgehalt im System 8%.

¹ Die Untersuchungen sind von der «Roche»-Studien-Stiftung unterstützt worden.

² F. MIESCHER, *Gesammelte histochemische und physiologische Arbeiten* (Leipzig 1897).

³ P. CARNOT und C. DEFLANDRE, C. r. Acad. Sci. 143 (1906).

⁴ B. v. BONNSDORF und E. JALAVISTO, Acta physiol. Scand. 16, 150 (1948).

⁵ Betr. Beschreibung des Spirometers und Ergometers s. Arbeiten von ED. JÉQUIER-DOGE und M. LOB, Rev. méd. Suisse romande 60, 540 (1940); J. méd. Leysin, Nr. 7 (1943); Sem. Hôp. Paris, Nr. 25 (1946); J. suisse Méd., Nr. 13 et 14 (1945); Helv. med. acta, im Druck (1950).

Tabelle I

Nr.	Retikulozyten in	Vor dem Hypoxieversuch	Während des Hypoxieversuches			Nach dem Hypoxieversuch			
			4 Minuten	10 Min.	20 Min.	10–20 Min.	1 Stunde	1½ Stunde	2 Stunden
1	^{0/00} Gesamtanzahl	2 10100			8 40300				12 60600
2	^{0/00} Gesamtanzahl	10 50700			17 85800	15 71400	17 83400		15 75700
3	^{0/00} Gesamtanzahl	11 49700		20 91600		20 90000	13 59400		8 36000
4	^{0/00} Gesamtanzahl	4 17800		12 57100		11 50300	5 22800		10 45400
5	^{0/00} Gesamtanzahl	7 31500		7 32400		6 27300	7 31900		11 50400
6	^{0/00} Gesamtanzahl	4 17400				12 54299		13 59500	
7	^{0/00} Gesamtanzahl	11 52900			21 103300	17 81600	15 72400		21 101600
8	^{0/00} Gesamtanzahl	12 60000	9 45000					18 90000	

Veränderungen in der Anzahl der Retikulozyten im Anschluß an einen kurzdauernden Hypoxieversuch.

Ein Unterschied in der Retikulozytenreaktion, dem Grade der Sauerstoffkonzentration entsprechend, konnte nicht nachgewiesen werden.

Tabelle I zeigt die Veränderungen der Retikulozytenzahl während des Hypoxieversuches und während der 2 unmittelbar darauffolgenden Stunden. *In sämtlichen Fällen war die Vermehrung im Verhältnis zum Anfangswert deutlich. Die kleinste Veränderung betrug 50%, d. h. eine Vermehrung von 60000 Retikulozyten auf 90000.*

Eine stark ermüdende Arbeit kann zu einer Retikulozytose vorübergehender Natur Anlaß geben. Es wurden vergleichende Untersuchungen vorgenommen, vorerst bei Personen ohne nachweisliche kardiopulmonäre Funktionsschwäche und hernach bei Personen mit respiratorischer Insuffizienz. *Wie aus Tabelle II hervorgeht, konnte bei ersteren weder eine relative, noch eine absolute Vermehrung nachgewiesen werden.* Dagegen schien

oft eine fallende Tendenz vorzuliegen, infolge einer Verminderung der Anzahl roter Blutkörperchen pro mm³ im Zusammenhang mit der Ergometrie. Die größte innerhalb 2 Stunden beobachtete Vermehrung betrug 31,6% (von 41360 auf 54450).

Ganz anders gestaltet sich die Retikulozytenkurve bei denjenigen Versuchspersonen, bei denen die Arbeit zu Sauerstoffmangel Anlaß gab. In Tabelle III sind 10 solche Fälle zusammengefaßt. Nur bei 2 Probanden war die Vermehrung 10 Minuten nach der Ergometrie unbedeutend, nämlich von 50160 auf 65550, bzw. von 27840 auf 32480, stieg aber innerhalb 2 Stunden auf 97440 bzw. 60580. Sämtliche anderen Untersuchten zeigten sofort, d. h. 10 Minuten nach der Arbeit, einen Wert, der den ursprünglichen um mehr als $\frac{2}{3}$ übertraf. Wird ausschließlich das Maximum innerhalb der 2 nächsten Stunden berücksichtigt, so erweist sich, daß die

Tabelle II

Nr.	Retikulozyten in	Vor der Ergometrie	Nach der Ergometrie		
			10 Minuten	1 Stunde	2 Stunden
1	^{0/00} Gesamtanzahl	20 99400	17 83470	20 97600	
2	^{0/00} Gesamtanzahl	6 28680	4 17120	2 8300	
3	^{0/00} Gesamtanzahl	11 51590	11 49830	12 54600	
4	^{0/00} Gesamtanzahl	7 33740	9 41680	8 37680	5 23550
5	^{0/00} Gesamtanzahl	3 17010	1 4820	1 4690	
6	^{0/00} Gesamtanzahl	12 60480	6 30540	9 41760	12 55680
7	^{0/00} Gesamtanzahl	8 41360	8 39200	11 54450	6 29400
8	^{0/00} Gesamtanzahl	11 55330	11 58300	10 48200	10 50000
9	^{0/00} Gesamtanzahl	12 58320	11 52470	12 58200	9 43470

Veränderungen in der Anzahl der Retikulozyten nach der Ergometrie bei Personen mit guter Lungenfunktion.

Tabelle III

Nr.	Retikulozyten n	Vor der Ergometrie	Nach der Ergometrie			
			10 Minuten	1 Stunde	2 Stunden	1–2 Tage
1	‰ Gesamtanzahl	9 44100	18 104760	28 143000		12 59000
2	‰ Gesamtanzahl	3 11700	9 33480	9 33480		7 26880
3	‰ Gesamtanzahl	8 35200	14 54600	13 52000	14 55860	8 36720
4	‰ Gesamtanzahl	5 23200	14 65380		17 79560	
5	‰ Gesamtanzahl	9 40860	16 73600	17 75990	4 17480	
6	‰ Gesamtanzahl	4 19320	14 66360	21 101430	20 96600	6 29280
7	‰ Gesamtanzahl	11 50160	15 65550	21 93870	21 97440	11 51150
8	‰ Gesamtanzahl	10 48300	18 82080	18 82260	24 110640	10 46800
9	‰ Gesamtanzahl	6 27840	7 32480	13 60580	9 41580	6 27720
10	‰ Gesamtanzahl	11 57420	16 85440	16 81760	23 117070	12 64320

Veränderungen in der Anzahl der Retikulozyten im Anschluß an die Ergometrie bei Personen mit respiratorischer Insuffizienz.

geringste maximale Steigerung doch 70,5% betrug. Nach Verlauf von 24 Stunden war wiederum ein Rückgang in der Retikulozytenzahl zu konstatieren. Bei sämtlichen untersuchten Personen wurde also eine überzeugende Vermehrung der Anzahl Retikulozyten im Zusammenhang mit der Ergometrie gefunden.

Daß die Retikulozytenreaktion bei Ergometrie mit einer verschlechterten Zuführung von Sauerstoff zu den Geweben in Zusammenhang steht, ist daraus ersichtlich, daß sie ausblieb, wenn ein Patient mit respiratorischer Insuffizienz während der ganzen Versuchsdauer eine an Sauerstoff reiche Luft einatmete.

Eine Verminderung des Sauerstoffgehaltes der Atmungsluft verursacht eine beinahe unmittelbar eintretende Erhöhung der Anzahl Retikulozyten. Bei den Hypoxieversuchen blieb die Vermehrung der Retikulozyten nur einmal aus, erreichte aber innerhalb der nächsten 2 Stunden 240%. In demjenigen Fall, wo die maximale Vermehrung innerhalb 2 Stunden nur 50% betrug, ist es möglich, daß die Höchstzahl nicht erfaßt wurde. Zählungen, welche während der folgenden Tage fortgesetzt wurden, zeigten, daß die Retikulozyten nach 8 Stunden auf 35000 gesunken waren (Anfangswert 60000); am zweiten Tag waren sie auf 111320 angestiegen und betrugen am fünften Tag noch 87210; während 10 weiteren Tagen waren die Werte wieder stabil (zwischen 53000 und 60000).

Auch Sauerstoffmangel infolge körperlicher Anstrengung bei Personen mit respiratorischer Insuffizienz gab eindeutig zu einer sowohl relativen als absoluten Erhöhung der Retikulozytenzahl Anlaß. Während bei Patienten mit Sauerstoffdefizit die kleinste Steigerung der Retikulozytenzahl innerhalb 2 Stunden 70,5% erreichte, betrug dieselbe bei dem Kontrollpatienten mit der stärksten Retikulozytenreaktion nur 31,6%. In der Kontrollgruppe war außerdem eine offenbare Tendenz bemerkbar zu einer Verminderung der Retikulozytenzahl 10 Minuten nach der Arbeit. Bei Sauerstoffdefizit hingegen wurde immer schon 10 Minuten nach dem Arbeitsversuch eine Vermehrung festgestellt, die nur in

einem Fall weniger als $\frac{2}{3}$ des anfänglichen Wertes betrug. Es scheint somit, als ob die in unmittelbarem Anschluß an die körperliche Arbeitsleistung eintretende Retikulozytenreaktion ein Kriterium ausmache hinsichtlich eines Vorhandenseins von kardiopulmonaler Insuffizienz, und daß die Reaktion mit Vorteil als Indikator bei Lungenfunktionsproben ausgenutzt werden könnte.

Eine Differenzierung der Reticulocyten nach HEILMEYER zeigte in unsern Versuchen nur in Ausnahmefällen eine Vermehrung der unreifen Zellen. Zu allererst hat man mit einer Ausschwemmung von reiferen Zellen zu rechnen. War die Reizung der erythropoietischen Organe besonders stark, oder wurde sie zu einem Zeitpunkt wiederholt, da die Emission von reiferen Zellformen kurz vorher bereits stattgefunden hatte, waren auch unreife Zellen im peripheren Blute vorzufinden. Es ist daher nicht auszuschließen, daß die in unmittelbarem Anschluß an Sauerstoffmangel bestehende Retikulozytenreaktion ihren Ursprung wenigstens teilweise in einer Erhöhung der Knochenmarkfunktion hat.

Herrn Dr. M. Lob, Oberarzt der Klinik, möchte ich für seine Mit Hilfe bei den Versuchen meinen Dank aussprechen.

NILS RISKA¹

Aus der medizinischen Universitätsklinik Lausanne, den 18. Mai 1950.

Summary

The author has studied the reticulocyte reaction in immediate connection with hypoxia tests of short duration, and with pulmonary function tests by spirometry and ergometry. The oxygen content of the inspired air during the hypoxia test varied between 8 and 13 per cent, and the test lasted 4 to 20 minutes. All the persons examined reacted within 2 hours of the test with an increase of at least 50 per cent in the number of reticulocytes. Within 2 hours after muscular exertion which brought about a spirometrically demonstrated deficit, an increase of at least 58.7 per cent in the total

¹ A complete report of this investigation will be published in English in the Acta med. Scand.

number of reticulocytes was observed. The increase failed to appear in persons subjected to the same amount of strain, but without spirometrically demonstrated oxygen deficiency. Similarly, the increase failed to appear in persons with impaired pulmonary function if the inspired air contained 60 per cent of oxygen during the course of the test.

Identification of Enteramine and Enteramine-Related Substances in Extracts of Posterior Salivary Glands of *Octopus vulgaris* by Paper Chromatography

Concentrated acetone extracts of posterior salivary glands of *Octopus vulgaris* were chromatographed on paper. Hereby we succeeded in localizing in well-defined spots enteramine A, enteramine I, and some other enteramine-related substances.

The identification of the enteraminic spots was accomplished by means of a whole series of colour reactions and by specific biological reactions.

The extracts submitted to chromatography had concentrations corresponding, per cc., to 2–20 g fresh salivary tissue. They were applied on Whatman No. 1 or No. 4 paper, in amounts of 0.002–0.01 cc.

Among the solvents with which we experimented, butanol saturated with HCl gave the best results in unidimensional chromatography. The acid solvent was followed, in the bidimensional chromatography, by the alkaline mixture pyridine–amylalcohol–water (2:2:1).

By spraying the chromatograms with a solution of the diazonium salts of paranitroaniline or sulfanilic acid and exposing them to ammonia vapours, numerous spots giving a positive alkaline azoreaction could be developed. They are schematically illustrated in Fig. 1 and 2. The

The problem of the nature of the other spots will be discussed in a future communication; at the present we permit ourselves to affirm that spots III and IX surely contain enteramine, as demonstrated by their peculiar chemical and biological characteristics. Spot III corresponds to enteramine A, spot IX to enteramine I¹. We are inclined to admit that enteramine I may be, at least partially, the product of an initial change of enteramine A; this view is supported by the usual weakness of spot IX in the chromatograms obtained with our fresher extracts.

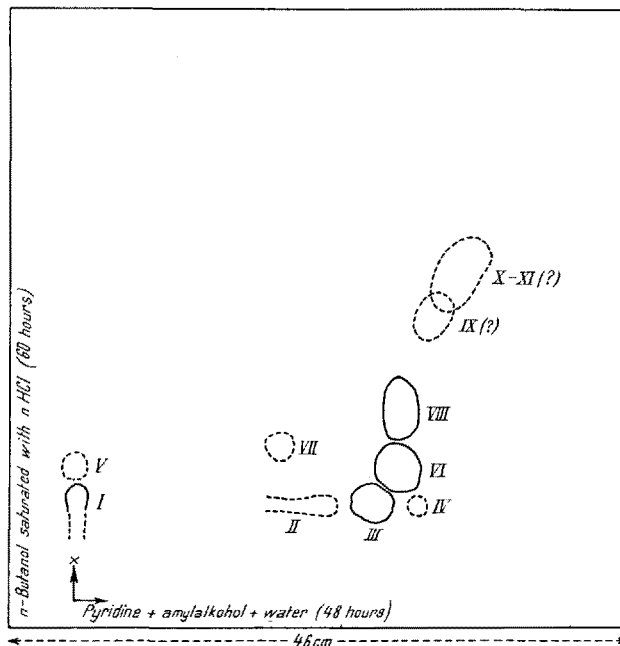


Fig. 2. – At the mark $\times 0.01$ cc. of the standard extract, corresponding to 2 g fresh salivary tissue.

The enteraminic or enteramine-like nature of spots I, II, IV is probable, but as yet not certain: in fact, they give all, or nearly all, the characteristic colour reactions of enteramine, from which they are, in this regard, practically indistinguishable, but they do not show the peculiar biological actions of enteramine. It is possible that the substances constituting spots I–II–IV preexist in the fresh tissue, but it is equally possible that they simply represent some decomposition products of enteramine.

The following approximative R_f values were obtained for the three enteraminic spots which separate better on unidimensional chromatograms: II = 0.11; III = 0.20; IX = 0.54.

Here are now, briefly, the data on which the above-mentioned conclusions are based:–

Colour reactions of the enteraminic spots. On untreated chromatograms, on which the solvent has just dried, spot III usually appears as a weak yellowish shade, which in time tends to become accentuated and to darken. Spot I, likewise, is often well visible, from the beginning as a reddish-yellow shade. Later on, spot IX and, much less distinctly, spots II and IV are delineated.

The true colour reactions of the enteraminic spots are, however, the following:–

¹ V. ERSFAMER, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 200, 60 (1942); Acta pharmacol. 4, 213 (1948).

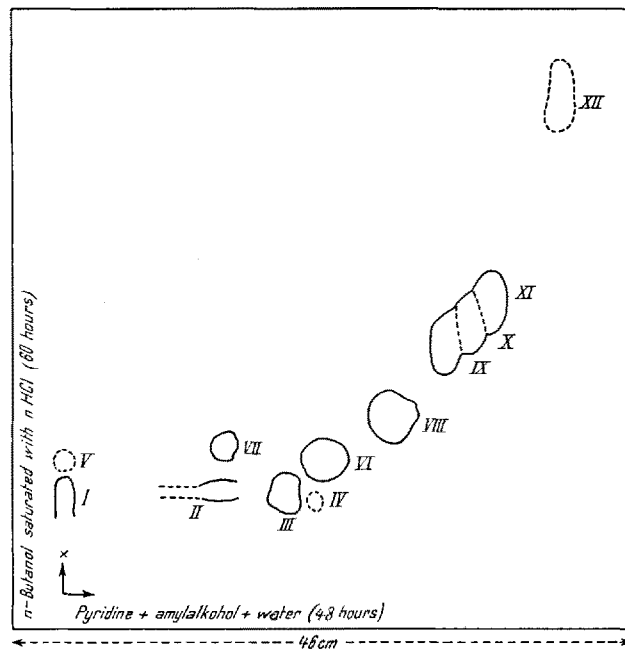


Fig. 1. – At the mark $\times 0.01$ cc. of the summer extract Vulg. CR₁, corresponding to 2 g fresh salivary tissue.

first refers to a salivary extract obtained in summer, 6 months old, and the second to a winter extract, quite recent and prepared from absolutely fresh material (standard extract).