



WACKER und V. SCHMIED-KOWARZIK<sup>1</sup> über die papierchromatographische Trennung von 8- und 9-Carbonsäuren. Die Gegenstromverteilung im genannten System ist also neben der Papierchromatographie<sup>1,2</sup> eine weitere empfindliche Methode zur qualitativen Identifizierung von Pterinen und bietet darüber hinaus noch die Möglichkeit der präparativen Trennung von Verbindungen dieser Reihe mit nicht zu ähnlichen Verteilungskoeffizienten (vgl. obiges Beispiel) und schließlich nach Aufstellen von Eichkurven für die einzelnen Vertreter auch der quantitativen Bestimmung.

H. M. RAUEN und H. WALDMANN

Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt a. M., den 9. Juni 1950.

#### Summary

Incubation of folic acid with liver homogenate causes a degradation product with remarkable blue fluorescence. The enzymatic reaction requires oxygen and is completely inhibited by HCN. The degradation product is not identical with xanthopterine, 2-amino-6-hydroxypteridine-aldehyde-8 or 2-amino-6-hydroxypteridine-carbonate (8) as is shown by some fluorescence properties and counter-current distribution. With the latter, 8-pteridinealdehyde and 9-pteridinealdehyde can be separated.

<sup>1</sup> F. WEYGAND, A. WACKER und V. SCHMIED-KOWARZIK, Exper. 6, 184 (1950).

<sup>2</sup> P. M. GOOD und A. W. JOHNSON, Nature 163, 31 (1949).

#### Über die Wirkung des Colchicins *in vivo* auf die alkalische Phosphatase der Rattenleber

Bei der Untersuchung über die Wirkung bestimmter karzinogener Substanzen auf die alkalische Phosphatase der Leber standen wir aus methodischen Gründen vor der Notwendigkeit, zunächst zu prüfen, ob das zur Arretierung auftretender Mitosen verwendete Colchicin von sich aus bereits die Aktivität des zu untersuchenden Fermentes beeinflusst. Aus der Literatur sind hierüber keine verwertbaren Angaben zu erhalten, da anscheinend entsprechende Untersuchungen *in vivo* bisher nicht durchgeführt wurden.

KEESER<sup>1</sup> fand Colchicin *in vitro* auf Kleinsche Dünndarm-Nukleotidase unwirksam, während die Serum-Nukleotidase gehemmt wird. LANG<sup>2</sup> und Mitarbeiter beobachteten bei Verwendung relativ hochkonzentrierter Colchicinlösungen ebenfalls *in vitro* eine deutliche Nukleotidasehemmung, während SCHOETENSACK<sup>3</sup> über eine Aktivierung sowohl der alkalischen Nierenphosphatase wie auch der Erythrozytenphosphatase *in vitro* durch  $10^{-3}$  mol. Colchicinlösung berichtet.

**Material und Methoden.** Verwendet wurden 24 weibliche Albino-ratten, 120–150 g schwer. 15 Tiere erhielten pro g Körpergewicht 2  $\mu$  Colchicin in 0,5 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst subkutan injiziert; wenn nicht anders angegeben, wurden die Tiere 18 Stunden später getötet. 9 Tiere blieben unbehandelt und dienten zur Kontrolle.

Die Bestimmung der Fermentaktivität erfolgte in 150 mg homogenisiertem Gewebsbrei bei 37,0°C und einem  $p_H$  von 8,8 nach 1stündiger Inkubation. Als Substrate wurden Natrium- $\beta$ -Glycerophosphat, Ribonukleinsäure und Desoxyribonukleinsäure verwendet. Die Bestimmung des anorganischen Phosphors erfolgte photokolorimetrisch nach FISKE und SUBBAROW<sup>4</sup>, modifiziert nach LOHMAN und JENDRASSIK<sup>5</sup>, im Falle der Nukleinsäuren nach einer unveröffentlichten Methode von KÜTSCHER<sup>6</sup>. Zur histochemischen Phosphatasebestimmung nach der Methode von GOMORI<sup>7</sup> wurden dünne Gewebsstücke in eiskaltem Aceton fixiert und entsprechend weiterbehandelt. Als Substrat wurden ebenfalls Natrium- $\beta$ -Glycerophosphat sowie Ribonukleinsäure verwendet. Die Inkubationszeit betrug 3 Stunden bei  $p_H$  9,2. Daneben wurde Material in Formalin bzw. nach CARNOVY fixiert und in üblicher Weise histologisch weiterbearbeitet.

**Befunde.** Die Leber geschlechtsreifer Ratten weist nur eine sehr geringe alkalische Phosphataseaktivität auf. Die quantitative Bestimmung der fermentativen Phosphorabspaltung ergab bei den Kontrolltieren folgende arithmetische Mittelwerte für:

Glycerophosphat  $\bar{x} = 0,53 \pm 0,036$ ; bei  $N = 9$  Tieren  
 Ribonukleinsäure  $\bar{x} = 0,13 \pm 0,0058$ ; bei  $N = 9$  Tieren  
 Desoxyribonukleinsäure  $\bar{x} = 0,288 \pm 0,014$ ; bei  $N = 5$  Tieren

Die angegebenen Werte bedeuten fermentativ abgespaltenen anorganischen Phosphor in mg, berechnet auf 1,00 g Lebergewebe; Inkubationszeit 1 Stunde bei 37,0°C bei einem  $p_H$  von 8,8; Pufferansatz nach KING und DELORY<sup>8</sup> in Abänderung nach AEBI<sup>9</sup>; Substratkonzentration 0,5%.

Nach subkutaner Injektion von 0,2 mg Colchicin je 100 g Körpergewicht ergaben sich folgende arithmetische Mittelwerte der fermentativen Phosphorabspaltung:

Glycerophosphat  $\bar{x} = 2,25 \pm 0,17$ ; bei  $N = 12$  Tieren  
 Ribonukleinsäure  $\bar{x} = 0,61 \pm 0,068$ ; bei  $N = 12$  Tieren  
 Desoxyribonukleinsäure  $\bar{x} = 0,415 \pm 0,062$ ; bei  $N = 11$  Tieren  
 (Tötung der Tiere nach 18 Stunden; übrige Bedingungen wie oben.)

<sup>1</sup> W. KEESER, Arch. exp. Pathol. 197, 187 (1941).

<sup>2</sup> K. LANG, G. SIEBERT und H. OSWALD, Exper. 5, 449 (1949).

<sup>3</sup> W. SCHOETENSACK, Arch. exp. Pathol. Pharm. 208, 215 (1949).

<sup>4</sup> C. H. FISKE und Y. SUBBAROW, J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).

<sup>5</sup> K. LOHMAN und L. JENDRASSIK, Biochem. Z. 178, 419 (1926).

<sup>6</sup> W. KÜTSCHER, persönliche Mitteilung.

<sup>7</sup> G. GOMORI, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 42, 23 (1939).

<sup>8</sup> E. J. KING und G. E. DELORY, Enzymologia 8, 278 (1940).

<sup>9</sup> H. AEBI, Helv. chim. acta 31, 1761 (1948).

Der Unterschied zwischen der alkalischen Phosphataseaktivität der Kontrolltiere und derjenigen der Colchicintiere wurde durch Mittelwertvergleich nach GOULDEN<sup>1</sup> und FISHER und YATES<sup>2</sup> statistisch gesichert. Der Mittelwertvergleich ergab für:

Glycerophosphat  $P \ll 0,001$  ( $t = 8,55$  bei  $n = 19$  Freiheitsgraden)  
Ribonukleinsäure  $P \ll 0,001$  ( $t = 7,60$  bei  $n = 19$  Freiheitsgraden)

Die Werte mit Desoxyribonukleinsäure als Substrat ergaben mit  $P > 0,3$  ( $t = 0,988$  bei  $n = 14$  Freiheitsgraden) keinen signifikanten Unterschied.

Je 1 Tier wurde nach 6-, 9- und 41stündiger Colchicin-Einwirkung getötet. Es ergaben sich folgende Werte:

Substrat	6 <sup>h</sup>	9 <sup>h</sup>	41 <sup>h</sup>
Glycerophosphat . . .	0,91	0,67	1,50
Ribonukleinsäure . . .	0,14	0,44	0,11
Desoxyribonukleinsäure	0,14	—	0,27

Entsprechend der geringen Phosphataseaktivität zeigt die normale Rattenleber auch bei der histochemischen Untersuchung erst nach relativ langer Inkubationszeit eine deutliche positive Reaktion. Um den Aktivitätsunterschied zwischen behandeltem und unbehandeltem Tier besonders deutlich sichtbar zu machen, wählten wir eine Inkubationszeit von 3 Stunden. Nach dieser Zeit zeigt die normale Rattenleber gerade die ersten Spuren einer positiven Reaktion in den Nucleoli der Leberparenchymzellen, das Zytoplasma bleibt negativ. Vom Gallengangssystem zeigen bei Verwendung von Glycerophosphat als Substrat nur die großen interlobulären Gallengänge eine starke positive Reaktion.

Vergleicht man hiermit die Fermentreaktion in den Lebern der colchicinbehandelten Tiere, so kann man folgendes feststellen: Nach 3stündiger Inkubation in Glycerophosphatsubstrat findet sich eine stark positive Reaktion vor allem in den Nucleoli der Leberzellkerne, das Zytoplasma zeigt eine leichte, aber deutliche, manchmal sogar ziemlich starke Aktivität. Besonders beeindruckend ist aber vor allem die starke Aktivität des Gallengangssystems, wobei sich in etwa der Hälfte der Fälle die Gallekapillaren sogar mit ihren Nebenästen außerordentlich deutlich darstellen.

Bei Inkubation in Ribonukleinsäure ist nach 3 Stunden ebenfalls in allen Fällen eine sehr starke Reaktion in den Nucleoli zu beobachten. Zum Unterschied jedoch zu den Glycerophosphatbefunden zeigen hier die Gallekapillaren und Gallengänge niemals eine positive Reaktion. Auch das Zytoplasma des Leberparenchym bleibet weitgehend negativ. Die Intensität der histochemischen Phosphataseaktivität verhält sich den quantitativ bestimmten Werten der Fermentaktivität entsprechend. So findet sich z. B. bei den in Tabelle III aufgeführten Tieren in der Leber des 6-Stunden-Tieres eine für die Colchicintiere typische histochemische Glycerophosphatasereaktion, jedoch ohne Reaktion der Gallekapillaren, während die Ribonukleinsäurespaltung an Intensität der Normalleber entspricht. Bei dem 41-Stunden-Tier reagieren dagegen mit Glycerophosphat auch die Gallekapillaren, während die Ribonukleinsäurespaltung ebenfalls außerordentlich gering ist. Umgekehrt ist beim 9-Stunden-Tier die Nukleinsäurespaltung sehr stark aktiviert, während im Glycerophosphatsubstrat nur die Nukleolen eine sehr schwache Reaktion zeigen.

<sup>1</sup> C. H. GOULDEN, *Methods of Statistical Analysis* (J. Wiley & Sons, New York, 1939).

<sup>2</sup> R. A. FISHER und F. YATES, *Statistical Tables for Research* (Oliver & Boyd, London, 1948).

Pathologische Veränderungen der Leber konnten 18 Stunden nach der Colchicinjektion nicht beobachtet werden. Ob eine echte Vergrößerung der Nukleolen und des Kernvolumens und eine Vermehrung der binukleären Zellen, wie es den Anschein hat, tatsächlich vorliegt, wird z. Z. quantitativ untersucht. Das 41-Stunden-Tier zeigte eine starke Fettleber.

*Diskussion der Befunde.* Während die Phosphataseaktivität in der normalen Rattenleber relativ gering und weitgehend konstant ist, fanden wir 18 Stunden nach einmaliger subkutaner Injektion von 0,2 mg Colchicin/100 g Körpergewicht bei Verwendung sowohl von Glycerophosphat wie auch von Ribonukleinsäure als Substrat eine Zunahme der Phosphataseaktivität um fast das Fünffache. Demgegenüber war die Aktivität bei Verwendung von Desoxyribonukleinsäure als Substrat nicht kennzeichnend erhöht. Dieser Aktivitätsanstieg ist in den ersten 10 Stunden noch nicht sehr ausgeprägt, kann aber noch nach 41 Stunden bei Verwendung von Glycerophosphat nachgewiesen werden. Die Ausscheidung des Colchicins erfolgt nach LETTRÉ<sup>1</sup> vornehmlich auf dem Wege Leber-Galle-Darm. Die histochemisch nachweisbare hohe Glycerophosphataseaktivität in den Gallekapillaren der Colchicintiere würde dieser Beobachtung entsprechen. Die erhöhte Fermentaktivität in den Nucleoli der Zellkerne des Leberparenchym, wie sie besonders bei Verwendung von Ribonukleinsäure als Substrat zu finden ist, lässt dagegen auf einen erhöhten Kernstoffwechsel schließen, da nach den Untersuchungen von BRACHET und JEENER<sup>2</sup> eine hohe Phosphataseaktivität in den Zellkernen auf einen erhöhten Umsatz des Nukleinsäurephosphors zurückzuführen ist.

GREENSTEIN<sup>3</sup> hat die Veränderungen des Nukleinsäuregehaltes der Kernelemente während der Mitose graphisch dargestellt, wobei er sich vor allem auf die Befunde von CASPERSSON stützte. Danach ist in der Prophase eine starke Abnahme des Ribonukleinsäuregehalts bei gleichzeitiger Vermehrung der Desoxyribonukleinsäure zu beobachten. In der späten Metaphase kehren sich die Verhältnisse um, und es kommt zu einem starken Anstieg des Ribonukleinsäuregehalts. Fermentchemisch gesehen wäre demnach mit einer erhöhten Aktivität einer Ribonukleinsäurephosphatase in der Prophase zu rechnen, während von der späten Metaphase an die synthetisierenden Vorgänge überwiegen. Da das Colchicin seine Wirkung als Mitosegift gerade im Moment beginnender Ribonukleinsäuresynthese entfaltet, ist zu erwägen, ob Zusammenhänge zwischen der mitosehemmenden Wirkung des Colchicins und der hier beschriebenen Phosphataseaktivierung bestehen.

HANS EBNER und HANS STRECKER

Universitätsfrauenklinik, Heidelberg, den 31. Mai 1950.

#### Summary

18 hours after the injection of 0.2 mg colchicine a statistically significant increase in the activity of alkaline phosphatase in the rat-liver was observed.

The desintegration of desoxyribonucleic acid was not significantly increased.

Histochemical investigation of the alkaline phosphatase activity yielded corresponding results with a characteristic heightening of activity in the cell nuclei.

The relations between the inhibiting effect of colchicine on mitosis and the activation of alkaline phosphatase are discussed.

<sup>1</sup> H. LETTRÉ und M. LUTZE, *Z. physiol. Chem.* 218, 58 (1944).

<sup>2</sup> J. BRACHET und R. JEENER, *Biochim. biophys. acta* 2, 423 (1948).

<sup>3</sup> J. P. GREENSTEIN, *Advances in Protein Chemistry I*, 275 (1944).