

with the mucosa. Very few tracks were observed in the emulsion beside the sections. This background is due to cosmic rays, which reach the plate during exposure in spite of the shield.

The typical distribution of the tracks is clearly seen in the photomicrographs (fig. 1), which show the section lying over the emulsion.

The results obtained in this work show that the method of track autoradiography may be capable of giving quantitative values of activity of  $S^{35}$  in tissue structures even within a minute volume of the section. In the present preliminary work, the capacity of the method has of course not been fully utilized in this respect. Further studies with  $S^{35}$  are proceeding and possible improvements of the track autoradiographical method are being searched for.

DAG CAMPBELL and BENGT H. PERSSON

Department of Histology, University of Upsala,  
January 15, 1951.

Zusammenfassung

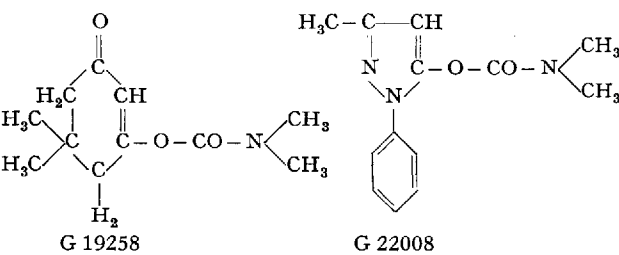
Die Fixierung von radioaktiven Sulfationen in ausgewachsenem Bindegewebe von Ratten wurde mit Hilfe von Spurautoradiographie studiert. Die Autoradiogramme zeigen eine deutliche Konzentration von  $S^{35}$  im Knorpel und verhältnismäßig wenige Spuren in anderen Bindegeweben. Die angewandte autoradiographische Methode ermöglicht die Bestimmung der Aktivität von  $S^{35}$  innerhalb sehr kleiner Gewebegebiete.

Zur Spezifität sogenannter Esterasegifte

Die Hemmung der zentralen und peripheren Cholinesterasen durch Diäthyl-*p*-nitrophenyl-thiophosphat (Parathion) wurde erstmals von DuBois und Mitarbeitern<sup>1</sup> in einer grundlegenden Arbeit beschrieben. Im Säugerorganismus zeigt dieses Insektizid einen cholinergischen Effekt und bewirkt bei höheren Dosen die für eine Erregung des Parasympathikus bzw. Vagus durch Azetylcholin typischen Symptome. Noch stärker treten die Wirkungen bei dem Sauerstoffanalogen Mintacol<sup>2</sup> in Erscheinung, das als Miotikum und Mittel zur Glaukombehandlung empfohlen worden ist. Eine intensive Hemmung der Fermentaktivität durch Parathion und verwandte Verbindungen wurde auch bei der aus Nervengewebe von Insekten gewonnenen Cholinesterase von METCALF und MARCH<sup>3</sup> beobachtet. Die beim Insekt auftretenden toxischen Symptome stehen in einer direkten Beziehung zum Ausmaß der Esterasehemmung; bei Eintritt des Todes wurde eine vollständige Blockierung des Enzyms festgestellt. Der Schluß erscheint berechtigt, daß diese Fermente den entscheidenden Angriffspunkt des Parathions bilden und daß somit ein ähnlicher

Wirkungsmechanismus vorliegt wie bei den auch chemisch verwandten Kampfstoffen der Phosphorsäuregruppe und weiterhin bei DFP, HETP und TEPP.

In den Forschungslaboratorien der I. R. Geigy AG., Basel, sind in neuester Zeit weitere hochwirksame Insektizide entwickelt worden, die chemisch einer ganz anderen Körperklasse angehören. Unter diesen Verbindungen beanspruchen die durch GYSIN dargestellten Urethane G 19258<sup>1</sup> und G 22008<sup>2</sup> ein besonderes Interesse.



Bei der Untersuchung dieser Verbindungen auf eine Inhibitorwirkung gegenüber Azetylcholinesterase wurde die Spezifität dieser Wirkung abgeklärt im Vergleich zum Effekt auf andere esterspaltende Fermente. Wir prüften die Wirkung der Präparate auf die Novocain-<sup>3</sup> und Cholinesterasen des menschlichen Blutes, ferner auf die Parpanitesterase<sup>4</sup> des Kaninchenplasmas. Die Bestimmung der Aktivität der azetylcholin-spaltenden Fermente erfolgte bei einer Substratkonzentration von 0,0066 m nach der manometrischen Methode von AMMON<sup>5</sup>, wobei die Pseudocholinesterase des Serums und die Cholinesterase aus hämolysierten Blutkörperchen getrennt zur Untersuchung kamen. Die Aktivität der Parpanitesterase wurde nach der von uns publizierten Arbeitsvorschrift<sup>4</sup> bestimmt. Mit gleicher Versuchsanordnung studierten wir auch das Verhalten der neuen Insektizide gegenüber der Novocainesterase. Die Substratkonzentration betrug hier 2 mg %, die analytische Bestimmung des Novocains erfolgte entgegen der zitierten Originalvorschrift<sup>4</sup> durch Extraktion mit Äthylen-dichlorid nach Bikarbonatzusatz, wobei das Pharmakon von seinem Spaltprodukt Diäthylaminoäthanol quantitativ abgetrennt werden kann. Bei den Hemmungsversuchen mit Eserin müssen die durch diese Base bedingten niedrigen Blindwerte bei allen Messungen berücksichtigt werden.

Als Vergleichspräparate haben wir das für Insekten ungiftige Parasympathikomimetikum Eserin sowie das Parathion, als typischen Vertreter der Insektizide aus der Gruppe von Phosphorsäureestern, in die Untersuchungen einbezogen. Für jedes Präparat wurde der Inhibitoreffekt bei verschiedenen Verdünnungen ge-

<sup>1</sup> K. P. DuBois, J. Doull, R. P. Salerno und J. M. Coon, J. Pharmacol. exper. Therap. 95, 79 (1949).

<sup>2</sup> W. Wirth, Arch. exper. Path. Pharmacol. 207, 557 (1949).

<sup>3</sup> R. L. Metcalf und R. B. March, J. Econ. Entomol. 42, 721 (1949).

<sup>4</sup> R. Wiesmann, R. Gasser und H. Grob, Exper. 7, 117 (1951).

<sup>5</sup> R. Wiesmann und C. Kocher, Z. angew. Entomol. (1951, im Druck).

<sup>6</sup> R. Hazard und J. Ravasse, Bull. Acad. Méd. 129, 585 (1945); C. r. Soc. Biol. 139, 13 (1945).

<sup>7</sup> R. Pulver, Arch. int. Pharmacodyn. 86, 185 (1951).

<sup>8</sup> R. Ammon, Arch. ges. Physiol. 233, 468 (1933).

	Konzentrationen, welche die Aktivität um 50% hemmen			
	G 19258	G 22008	Parathion	Eserin
Cholinesterase . . . . .	2,0 · 10 <sup>-4</sup> m	1,2 · 10 <sup>-5</sup> m	1,5 · 10 <sup>-3</sup> m	6,7 · 10 <sup>-7</sup> m
Pseudocholinesterase . . . . .	1,6 · 10 <sup>-5</sup> m	6,1 · 10 <sup>-7</sup> m	9,6 · 10 <sup>-5</sup> m	2,8 · 10 <sup>-7</sup> m
Parpanitesterase . . . . .	4,5 · 10 <sup>-8</sup> m	3,6 · 10 <sup>-9</sup> m	1,9 · 10 <sup>-5</sup> m	> 0,3 · 10 <sup>-4</sup> m
Novocainesterase . . . . .	7,5 · 10 <sup>-6</sup> m	2,0 · 10 <sup>-7</sup> m	6,0 · 10 <sup>-6</sup> m	1,5 · 10 <sup>-7</sup> m

messen. Dabei ergaben sich Dosiswirkungskurven, aus welchen die Konzentrationen zu ermitteln sind, die eine Esterasehemmung von 50 % bewirken.

Aus der Zusammenstellung der Versuchsergebnisse ist ersichtlich, daß die beiden neuen Insektizide G 19258 und G 22008 auffallend starke Hemmungseffekte zeigen. Dabei ist die Wirksamkeit gegenüber den verschiedenen Esterasen größenordnungsmäßig verschieden. Die *Cholinesterase* der roten Blutkörperchen wird durch sie zwar schwächer als durch Eserin, aber erheblich stärker als durch Parathion beeinflusst. G 22008 besitzt gegenüber der *Pseudocholinesterase* des menschlichen Serums nahezu eine gleich starke Wirksamkeit wie Eserin.

Die *Parpanitesterase* wird schon durch außerordentlich niedrige Konzentrationen der beiden Urethane gehemmt, während Parathion und besonders Eserin hier eine viel geringere Wirkung entfalten. Dagegen wird die *Novocainesterase* sowohl durch Eserin als auch durch die Urethane sehr stark beeinflusst. Durch geeignete Eserinkonzentrationen kann die Novocainesterase spezifisch gehemmt werden, während die Parpanitesterase aktiv bleibt. Umgekehrt kann die Parpanitesterase durch G 19258 oder G 22008 blockiert werden ohne gleichzeitige Hemmung der Novocainesterase. Das spezifische Verhalten der beiden Fermente gegenüber den Inhibitoren zeigt erneut, daß die beiden Diäthylaminoäthanolester, Parpanit und Novocain, im Organismus durch verschiedene Enzyme abgebaut werden. Diese Beobachtung bildet andererseits einen Hinweis auf die Spezifität der Esterasen (vgl. 1).

Im Tierversuch haben wir festgestellt, daß die Parpanit und Novocain abbauenden Fermente des Serums durch sehr kleine Dosen von G 22008 *in vivo* blockiert werden. Es handelt sich dabei um eine reversible Hemmung, die nur während Stunden nachweisbar ist. Versuche zur Abklärung der praktischen Bedeutung dieses Befundes sind im Gange.

R. PULVER und R. DOMENJOZ

Pharmakologische Laboratorien der J. R. Geigy AG., Basel, den 14. März 1951.

Summary

The inhibitory effect of various insecticides on the esterases of the blood has been measured and compared with the effect of Eserine. The ferments which split Choline, Panparnit (Parpanit) and Procaine (Novocaine) respectively, show a different behaviour towards these inhibitors. This is interpreted as a hint to the specificity of the esterases.

<sup>1</sup> R. PULVER, Arch. int. Pharmacodyn. 86, 185 (1951).

Effect of Indirubin on White Blood Cell Count of the Guinea Pig<sup>1</sup>

RIMINGTON, HOLIDAY and JOPE<sup>2</sup> were able to isolate indirubin from urine of patients suffering from sprue. On the other hand, FRIEDMANN and JACOBSON<sup>3</sup> isolated three substances from urine of patients suffering from chronic myelogenous leucaemia: a yellow pigment, a colourless crystalline substance and a crystalline purple

pigment. They furthermore identified the purple pigment as indirubin<sup>1</sup>.

We thought it might be interesting to investigate the effect of this substance on the white blood cell count and on the number of circulating eosinophils of the guinea pig. We therefore injected subcutaneously 1 mg indirubin dissolved in 1/2 ml olive oil. A blood cell count, a eosinophil count (direct count) and a differential count were made after 3, 6, 8, 10, 12, 24, 32 hours. The results in one guinea pig are shown in table I.

Table I

Hours	White blood cell count	Eosinophils (direct count)	Granulocytes <sup>2</sup>	Lymphocytes <sup>2</sup> + Monocytes
0	8,700	638	3,654	4,524
1	Indirubin 1 mg/1/2 cm <sup>3</sup> olive oil			
3	8,500	417	2,380	5,610
6	7,000	250	2,870	3,150
8	6,800	139	3,060	3,468
12	5,100	117	1,581	3,264
24	7,000	278	1,550	4,900
32	8,100	495	2,106	5,832

The effect was controlled in ten guinea pigs. During the first nine to eleven hours, there is a drop in the total amount of leucocytes of about 25 to 50 %; of the eosinophils of 60 to 75 %. In the control tests (4 guinea pigs), after injection of the solvent alone (1/2 ml olive oil), we found fairly constant values through the whole course of the experiment. An example is shown in table II.

Table II

Hours	White blood cell count	Eosinophils (direct count)	Granulocytes <sup>2</sup>	Lymphocytes <sup>2</sup> + Monocytes
0	11,000	239	990	9,680
1	1/2 cm <sup>3</sup> olive oil			
3	10,900	261	3,924	6,322
7	10,600	394	5,406	4,452
9	11,700	294	5,499	5,616
11	9,500	339	2,565	6,270
25	10,100	333	2,525	7,272
27	10,800	300	4,212	6,156

The mechanism of these changes is still not known. According to RIMINGTON, a high-protein diet causes an increase of the amount of indirubin in the urine. Indirubin might therefore quite possibly exercise, as a protein-tryptophan-metabolite, a mere toxic inhibiting effect on the haematopoietic organs. The role of the adrenals may be an indirect one in inducing the eosinopenia, as a drop in the number of eosinophils, caused by direct ACTH injection, occurs within 2-6 hours after the injection, but is accompanied by a rise in the number of granulocytes.

As beta-indolyl-acetic acid has also been isolated from urine<sup>3</sup>, indirubin could be a product of the metabolism

<sup>1</sup> E. FRIEDMANN, D. H. MARRIAN, and M. F. PERUTZ, Biochim. and biophys. acta 5, 45 (1950).  
<sup>2</sup> Calculated: differential count (%) (W.BC/100).  
<sup>3</sup> F. KÖGL, A. J. HAAGEN SMIT and H. ERXLEBEN, Z. physiol. Chem. 228, 90 (1934).

<sup>1</sup> Aided with a grant from the "Cancer Center" of the University.  
<sup>2</sup> C. RIMINGTON, E. R. HOLIDAY, and E. M. JOPE, Biochem. J. 40, 669 (1946).  
<sup>3</sup> E. FRIEDMANN and W. JACOBSON, Nature 157, 337 (1946).