

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.

1 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

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

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

of phyto-hormone-like substances. The fact also that BÜNGELER<sup>1</sup> was able to induce leucaemia and sarcoma by chronic indol-poisoning of mice, makes further investigation of the indol-derivatives well worth while.

B. C. DE LANDSHEERE

Interne Kliniek, Ghent (Belgium), February 20, 1951.

I wish to thank Prof. BRADLEY and Dr. J. E. CROSS, Senior Lecturer, Department of Colour Chemistry, Leeds University, for kindly supplying a sample of indirubin.

### Résumé

L'indirubine a été isolée par RIMINGTON, HOLIDAY et JOPE par extraction d'urines humaines. FRIEDMANN et JACOBSON ont par la suite extrait d'urines de malades atteints de leucémie myélogène chronique un produit cristallin pourpre, qui a été identifié comme étant aussi de l'indirubine.

Une dose unique d'indirubine en injection souscutanée (1 mg dans  $\frac{1}{2}$  ml d'huile d'olive) provoque chez le cobaye une leucopénie, une granulocytopenie et une éosinopénie, dont l'effet le plus manifeste se produit douze heures après l'injection.

L'auteur suppose que l'indirubine pourrait être un simple produit de catabolisme du tryptophane protidique et que son action sur le système hémopoïétique ne serait que purement toxique. D'autre part, l'acide bêta-indolyl-acétique (auxine *b*) a aussi été extrait d'urines humaines. Il est possible que l'indirubine soit un produit du métabolisme de substances de croissance (phytohormones). Le fait encore que des leucémies et des sarcomes ont pu être provoqués chez la souris par intoxication chronique d'indol, rend l'étude plus approfondie de dérivés de l'indol intéressante.

<sup>1</sup> W. BÜNGELER, Frankf. Z. Path. 44, 202 (1933).

### Wirkung von Harnextraktstoffen auf die Bewegungsreaktionen der Leukozyten

Es ist bekannt, daß aus Schwangerenurharn Stoffe gewonnen werden können, die nach Injektion am Menschen und am Tier zu Veränderungen des weißen Blutbildes führen; diese Stoffe werden dargestellt mit jenen oder analogen Verfahren, die zur Gewinnung von gonadotropem Hormon aus Urin angewendet werden<sup>1</sup>. Weiterhin sind Fraktionen vorhanden, welche auf die Magensaftsekretion und auf die Ulkusbildung des Magens wirken<sup>2</sup>. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß entweder gonadotropen Fraktionen andere Wirkstoffe beigemischt sind, welche allgemeine Zellwirkungen besitzen, oder daß aus den gonadotrop wirkenden Fraktionen solche bei verschiedenartiger chemischer Bearbeitung gewonnen werden können.

Es wurde, um etwas einfachere Versuchsbedingungen zu schaffen, der Versuch gemacht, festzustellen, ob «gonadotrope Fraktionen» Stoffe enthalten, welche direkte Zellwirkungen besitzen. Es wurde hierzu die Wirkung auf die Lokomotion der Leukozyten untersucht, und zwar wurde sowohl die Wirksamkeit auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen als auch ihre chemo-

taktische Wirksamkeit bestimmt. Die Versuchsanordnung war die gleiche, wie sie bereits in früheren Arbeiten benutzt wurde<sup>1</sup>.

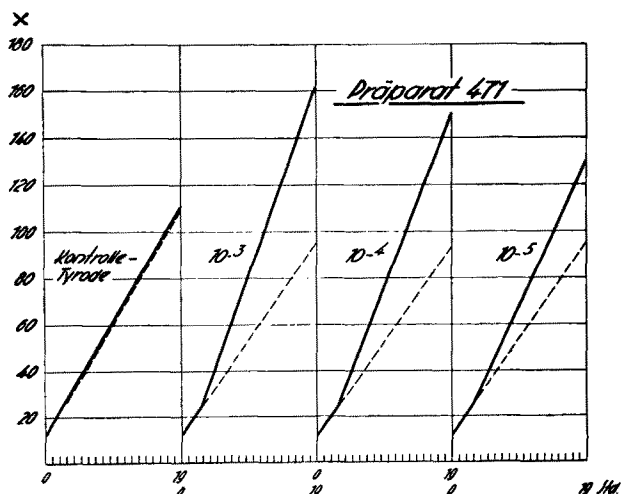


Abb. 1. Beschleunigung der Auswanderung von Leukozyten *in vitro* durch verschiedene Konzentrationen von Schwangerenurharnextrakt. Abszisse: Auswanderungsfläche in relativem Maß. Ordinate: Zeit in Stunden.

Die Leukozyten vom Huhn wurden in der üblichen Weise aus dem Plasmagerinnsel nach Zentrifugieren isoliert und die Leukozyten enthaltenden Plasmastückchen in Carrelflaschen angesetzt. Für die zwei verschiedenen Versuchsanordnungen wurden die Fraktionen des gonadotropen Hormons entweder auf den festen Nährboden in Tyrode gelöst überschichtet oder als feste amorphe Substanz, bzw. in Lösung in einem Abstand von etwa 4 mm von der «Leukozytenkultur» auf die Oberfläche des Plasmalnährbodens angebracht. Das Resultat der Versuche wurde nach 19 Stunden festgestellt.

**Resultate.** Nach Prüfung einer größeren Reihe von Urinextrakten wurden solche Fraktionen gonadotropen Hormons gefunden, welche sowohl eine stark positive Wirkung auf die Auswanderungsgeschwindigkeit als eine chemotaktische Wirkung besitzen. Die Versuchsergebnisse sind in den anliegenden Abbildungen gekennzeichnet. Gewisse Fraktionen sind imstande, besonders die Auswanderungsgeschwindigkeit der Leukozyten noch in Konzentrationen von etwa  $10^{-5}$  zu erhöhen. Andere Fraktionen enthalten mit großer Wahrscheinlichkeit Substanzen, welche eine negative Wirkung in dieser Versuchsanordnung haben, so daß es nicht ganz ausgeschlossen ist, daß auch «Rohextrakte», die in dieser Versuchsanordnung vorläufig unwirksam gefunden wurden, zufällig durch eine Mischung von positiv und negativ wirkenden Stoffen nur scheinbar unwirksam sind, so daß bei weiterer Separation der Wirkstoffe auch solche sich noch als wirksam ergeben könnten. Diese Frage bedarf weiterer Abklärung.

Die Untersuchung der von der chemotaktischen Reaktion betroffenen Zellen zeigt, daß es sich im wesentlichen um Elemente handelt, die im Plasma azidophile Granula aufweisen, aber keine Peroxydasereaktion geben. Dies ist auch bei anderen chemotaktisch wirksamen Prinzipien, wie zum Beispiel Bakterien usw., der Fall, so daß offenbar die in diesen Fraktionen nachweisbaren chemotaktisch wirksamen Stoffe sich ähnlich verhalten wie die als Bakterienchemotaxine zu bezeichnenden.

<sup>1</sup> R. MEIER, Helv. chim. acta 24, 134 (1941).

<sup>1</sup> R. ABDERHALDEN, Z. Vitamin-, Hormon- und Fermentforsch. 2, 365 (1948/49); – H. DE WATTEVILLE, Gynaecologia 126, 207 (1948). – R. MEIER, W. SCHULER und F. BENZ (Unveröffentlichte Arbeiten).

<sup>2</sup> Siehe bei F. R. SKELTON und G. A. GRANT, Canad. J. Res. 28, 85 (1950).