

Nach verschiedenen *In-vivo*-Beeinflussungen, wie grossem Blutverlust, anaphylaktischem Schock, experimenteller Verbrennung oder Erfrierung sowie nach Chloroformvergiftung, wurde eine bisweilen beträchtliche Zunahme von Serum-ChE gefunden¹. Da dieselbe aber in der Leber gebildet wird², muss ursächlich für die

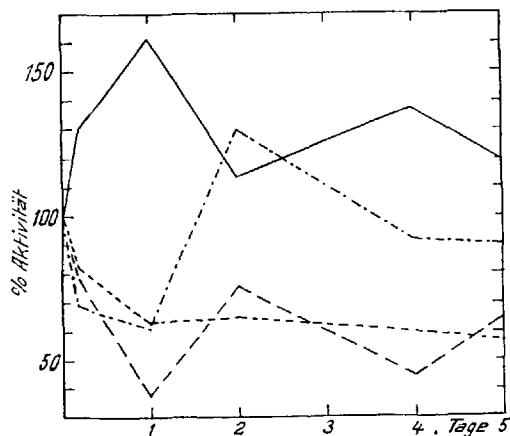


Abb. 5. Parathion 1 mg/kg.

beobachtete Aktivitätssteigerung angenommen werden, dass die Bildung oder Abgabe des Fermentes verstärkt ist oder dass aus der Leber und auch anderen Geweben Aktivatoren der ChE bzw. Stoffe, welche Inaktivatoren hemmen, vermehrt ins Blut abgegeben werden (SCHÜMMELFEDER³). In solchen Fällen kann aber auch vermutet

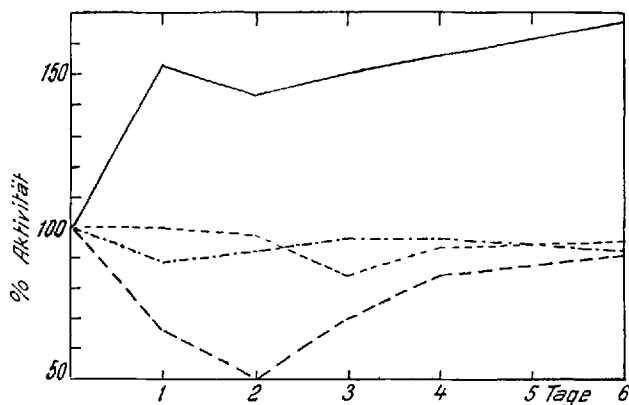


Abb. 6. Parathion 0,1 mg/kg.

werden, dass die ChE-Aktivität der Bildungsstätte selbst ebenfalls erhöht ist. Wenn von den Alkylphosphaten ein Teil zerstört⁴ oder ausgeschieden wird⁵ und nur mehr geringe Konzentrationen übrigbleiben, könnten diese ebenso wie die erwähnten Noxen stimulierend auf die Bildungsstätten der ChE wirken bzw. die Aktivität

vorhandener ChE steigern, wie es *in vitro* für verschiedene Substanzen und auch für ein Alkylphosphat selbst gezeigt werden konnte¹. Hierbei scheint eine gewisse spezifische Wirkung vorzuliegen, indem Parathion anscheinend Plasma-ChE stimuliert, während Pestox XV Plasma- und Erythrozyten-ChE (letztere in stärkerem Maße), Pestox XIV Gehirn- und Leber-ChE und Pestox III im untersuchten Zeitraum Gehirn-ChE bevorzugt in aktivierendem Sinne angreifen. Die Ursache für diese Verschiedenartigkeit der Wirkung wird wahrscheinlich vor allem in der Verteilung der Substanzen im Organismus zu suchen sein. Auch dürfte das unterschiedliche Verhalten von Plasma-ChE und Erythrozyten-ChE nach Parathion *in vivo* und *in vitro* (in letzterem Fall sind Plasma- und Erythrozyten-ChE stark gehemmt²) in ähnlicher Weise zu erklären sein wie die Unterschiede zwischen *In-vivo*- und *In-vitro*-Wirkung bei TEPP (HOBBIGER³ und Pestox III⁴).

Pestox III, XIV und XV sowie Parathion wurden uns vom Chemical Research Dept. Pest Control Ltd., Harston, Cambridge, zur Verfügung gestellt. Für Acetylcholin schulden wir der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, Dank.

A. LOCKER und H. SIEDEK

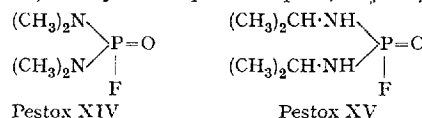
I. Medizinische Klinik der Universität Wien, den 1. Oktober 1951.

Summary

Various alkylphosphates show in certain doses by application *in vivo* a stimulating effect on the cholinesterase activity of plasma, erythrocytes, liver and brain respectively. These effects might be due to a different distribution of the alkylphosphates in the body and a stimulatory effect of low concentrations on the new formation or the activity of the enzymes.

¹ E. KEESER, Klin. Wschr. 17, 1811 (1938). – V. GROSSMANN und B. KASALICKY, C. r. Soc. Biol. 144, 93 (1950). – E. FROMMEL, A. D. HERSCHBERG und J. PIQUET, C. r. Soc. Phys. Hist. nat. Genève 60 (in Arch. Sci. phys. nat. 25) 97 (1943). – K. B. AUGUSTINSON, Cholinesterases (Stockholm 1948). – A. LOCKER und H. SIEDEK (unveröffentlicht). – A. TODRICK, K. P. FELLOWES und J. P. RUTLAND, Biochem. J. 48, 360 (1951).

² D. GROB, Bull. Johns Hopkins Hosp. 87, 95 (1950).



Pestox XIV

Pestox XV

³ F. HOBBIGER, Brit. J. Pharmacol. 6, 21 (1951).

⁴ A. LOCKER und H. SIEDEK, Mh. Chem. (im Druck).

Mise en évidence et estimation de la Catalase sanguine¹

La catalase sanguine détruirait H_2O_2 dès sa formation au cours des processus d'oxydation et protégerait ainsi les cellules contre la nocivité que possède ce peroxyde dès qu'il atteint une certaine concentration. D'autre part, suivant KEILIN², quand la pression d'oxygène est très basse, la catalase serait susceptible d'intervenir directement dans les oxydations et jouer un rôle autre que celui de diastase de protection.

Le procédé ci-après décrit met en évidence une activité catalasique du sérum frais, aseptiquement prélevé

¹ Le terme «catalase» est employé ici pour déterminer tout ferment susceptible de décomposer les peroxydes.

² M. POLONOWSKY, Biochimie Médicale, III^e éd. (Masson, Paris) p. 666.

¹ M. PIROLLO, Boll. Soc. ital. Biol. sper. 17, 437 (1942). – F. HEIM, Klin. Wschr. 24/25, 115 (1946). – N. SCHÜMMELFEDER, Arch. exp. Path. Pharm. 204, 466, 567 (1947). – A. DA CRUZ und F. B. PEREIRA, C. r. Soc. Biol. 144, 1573 (1950).

² M. FABER, Acta med. Scand. 114, 72 (1943). – CH. H. SAWYER und J. W. EVERETT, Amer. J. Physiol. 143, 675 (1947). – M. F. HARRISON und L. M. BROWN, Biochem. J. 48, 151 (1951).

³ N. SCHÜMMELFEDER, Arch. exp. Path. Pharm. 204, 466, 567 (1947).

⁴ A. MAZUR, J. Biol. Chem. 164, 271 (1946).

⁵ D. HOFMANN-CREDNER und H. SIEDEK, Arch. int. Pharmacodyn. (im Druck).

et ne présentant pas d'hémolyse. Nous nous bornons à en indiquer le mode opératoire que nous avons établi, nous abstenant d'interpréter la fonction catalasique que nous dosons. Signalons toutefois qu'en règle générale les huit premiers tubes de la série dénotent l'activité catalasique rencontrée chez des sujets réputés normaux.

Nous avons également expérimenté sur du sérum de lapin, dont la catalase était relativement élevée, et avons établi que le foie et le rein du même animal accusaient, à poids égal, une activité catalasique de vingt-cinq fois supérieure à celle donnée par le sérum, la rate, les poumons, les surrénales et le muscle strié.

Une série de lapins accusèrent une augmentation passagère de leur catalase sanguine à la suite d'injection de tétrachlorure de carbone provoquant l'altération du foie. Dans la suite, l'intoxication s'étendant vraisemblablement, la teneur de la catalase sanguine s'abaissa à des niveaux extrêmes. Tout se passe comme si la présence d'un organe producteur de catalase et non touché par l'injection du toxique compensait la déficience du foie, momentanément du moins. Cette compensation, si l'on s'en réfère aux travaux de THEORELL¹, pourrait être opérée par la moelle osseuse, les centres de formation de la catalase devant être respectivement la moelle osseuse et le foie, la première étant celle qui fournirait la catalase du sang circulant.

De même des sérums à Takata-Ara très positifs accusent souvent un net glissement à gauche de l'index catalasique. Enfin, dans une étude relative au parallélisme qui existe chez l'animal entre l'activité de sa catalase et un régime carencé en azote, NORA BARGONI² établit une diminution de cette activité.

Lors de la mise en œuvre du procédé de détection de la catalase, on se mettra à l'abri d'erreurs certaines introduites par l'usage de sérums vieux ou non stériles, l'action catalasique pouvant se perdre par la conservation ou être simplement due à la présence de catalase microbienne.

On opérera dans du matériel rigoureusement propre et stérilisé, non rugueux et traité régulièrement au mélange chromique. Les pipettes seront bouchées au coton afin d'éviter l'introduction de salive dans les tubes à réaction.

On évitera également d'opérer sur des sérums présentant de l'hémolyse. A ce propos nous citons BROCC-ROUSSEU et ROUSSEL³ qui, moyennant une récolte de sérum indemne de fautes de technique: «*agitation pendant la coagulation, présence d'eau dans les conserves, hémolyse par contamination, retard apporté à la décantation du sérum, etc.*», considèrent que le sérum ne doit pas contenir d'hémoglobine décelable qui pourrait fausser les résultats par son pouvoir catalasique propre.

«*Lorsque le sérum a été obtenu par coagulation et par un repos suffisamment prolongé, il devient impossible d'y déceler la présence de traces donnant les colorations caractéristiques des oxydases, des peroxydiastases, ou d'autres corps liés à ce groupe de substances ou de propriétés. Pourtant les réactifs dont nous disposons pour ces réactions colorées sont d'une extrême sensibilité et nous n'avons jamais pu déceler chimiquement la présence d'hémoglobine dans le sérum avec une sensibilité de 1/10 000.*»

Nous opérons sur des sangs prélevés en tubes à centrifuger, centrifugés à vitesse moyenne dans le même tube après rétraction du caillot, décantés et recentrifugés en l'absence du caillot et négatifs à la benzidine.

Réactifs nécessaires

1° Solution Tampon.

Solution A: KH_2PO_4 sec, 2,27 g.

Eau bidistillée ad 100 cm³.

Solution B: Na_2HPO_4 sec, 2,97 g.

Eau bidistillée ad 100 cm³.

Ces solutions sont conservées séparément en glacière. Au moment de l'emploi on mélange 3 cm³ de A avec 10 cm³ de B.

2° Acide Sulfurique; Normalité 1/3.

3° Solution de Rivanol à 1 %.

4° Solution de NaNO_2 N/10 à 6,9 g/100.

On la titre par KMnO_4 N/10.

Une solution de KMnO_4 normale oxyde, volume à volume, une solution demi-molaire de HNO_3 .

Par suite de la volatilité de l'acide nitreux on verse dans une burette la solution de nitrite et on la fait couler dans une quantité déterminée de KMnO_4 N/10 chauffée à 40° après avoir dilué celle-ci à 400 cm³ et acidulé par 30 cm³ de H_2SO_4 au tiers.

$2 \text{KMnO}_4 + 5 \text{HNO}_2 + 3 \text{H}_2\text{SO}_4 = \text{K}_2\text{SO}_4 + 2 \text{MnSO}_4 + 5 \text{HNO}_3 + 3 \text{H}_2\text{O}$. On conservera la solution de nitrite à la glacière. Durée de conservation: un mois.

5° Solution de Perhydrol à 1 %.

On prépare cette solution en diluant, lors de l'emploi, 1 cm³ de Perhydrol ad 100 cm³ dans un flacon jaugé.

Pour la titrer on en verse 10 cm³ dans un bœcher, on étend à 200 cm³ avec de l'eau bidistillée et on ajoute 30 cm³ de H_2SO_4 à 20 %. On titre par KMnO_4 N/10.

$2 \text{KMnO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}_2 + 4 \text{H}_2\text{SO}_4 = 2 \text{KHSO}_4 + 2 \text{MnSO}_4 + 8 \text{H}_2\text{O} + 5 \text{O}_2$.

6° Equivalence des solutions de H_2O_2 et NaNO_2 .

Soit x cm³ de KMnO_4 N/10 employés lors de la titration de H_2O_2 à 1 %. On porte 10 cm³ de H_2O_2 à 1 % à x cm³.

1 cm³ de cette dernière dilution de H_2O_2 correspond à 1 cm³ de NaNO_2 N/10. Le mélange de ces deux derniers centimètres cubes, acidifié et mis en présence de 0,2 cm³ de solution de Rivanol, ne doit pas donner de coloration rouge violacée.

Technique opératoire

Dans un flacon jaugé de 25 cm³ on dilue au vingtième 1,25 cm³ de sérum de la façon suivante:

1,25 cm³ de solution Tampon.

20 cm³ de solution stérile de NaCl à 0,9 %.

1,25 cm³ de sérum.

On mélange et on porte à 25 cm³ avec la solution de NaCl à 0,9 %. Dans une série de 12 tubes de 120 · 15 mm on introduit 2 cm³ de cette dilution.

On ajoute à chaque tube, en partant du premier de gauche, respectivement et exactement, à la burette divisée en 20° de centimètre cube

1 cm³, 1,10 cm³, 1,20 cm³, 1,30 cm³, 1,40 cm³, 1,50 cm³, 1,75 cm³, 2 cm³, 2,25 cm³, 2,50 cm³, 3 cm³, 3,50 cm³ de solution de Perhydrol à 1 %.

On mélange doucement et on maintient cette série de tubes à l'étuve à 37° durant 30 min.

Après ce temps on ajoute à chaque tube 1 cm³ de H_2SO_4 N 1/3.

On mélange doucement et on ajoute partout, à la burette, exactement 1 cm³ de solution de NaNO_2 .

On mélange à nouveau et on ajoute enfin, après 10 min, 0,2 cm³ de solution de Rivanol en laissant couler cette solution le long de la paroi du tube. On ne mélange pas.

¹ H. THEORELL, *Jama* 1020 (1950).

² NORA BARGONI, *Exper.* 7, 104 (1951).

³ D. BROCC-ROUSSEU et G. ROUSSEL, *Le sérum normal* (Masson, Paris 1934), p. 191.

Les tubes dans lesquels il est resté assez de H_2O_2 pour transformer du nitrite en nitrate, c'est-à-dire dans lesquels tout le H_2O_2 n'a pas été décomposé par la catalase, restent jaunes. Les autres tubes montrent un anneau rouge violacé apparaissant après quelques secondes. Ces tubes accusent la teneur du sérum en catalase et cette teneur sera jugée d'autant plus importante d'après que l'apparition de la couleur violacée reculera davantage vers la droite.

On peut exprimer l'activité catalasique du sérum par la quantité mathématique de H_2O_2 décomposée par centimètre cube de sérum. Cependant, pour des raisons pratiques, il sera tout aussi démonstratif de la déterminer par le numéro d'ordre du dernier tube dans lequel la couleur rouge violacé caractéristique s'est développée.

J. LEURQUIN et J. P. DELVILLE

Laboratoire Médical de la Colonie, Elisabethville, Congo Belge, le 31 octobre 1951.

Summary

A technique is given for the detection and quantitative estimation of the catalase activity of the blood serum by measuring its capacity to decompose hydrogen peroxide.

Die Beeinflussung der Thrombin-Fibrinogen-Reaktion durch Penicillin, Streptomycin und Aureomycin

Die im folgenden beschriebenen Versuche zeigen die Beeinflussung der Gerinnung menschlichen Plasmas durch die Antibiotika Penicillin, Streptomycin und Aureomycin. Die Versuche wurden in der Absicht unternommen, den Einfluss der Antibiotika auf die Bildung eines künstlichen Fibrinfilmes aus Plasma und Thrombin festzustellen.

Bei therapeutischer Anwendung wurde bald nach Beginn der antibiotischen Ära bei Penicillin und Streptomycin eine Verkürzung der Gerinnungszeit (GZ.) beschrieben, die sowohl bei parenteralen Gaben auftrat (MOLDAVSKY, HASSELBROOK und CATENO¹) als auch bei oraler Anwendung (MACHT²). Die Meinungen über die gerinnungsaktive Wirkung des Aureomycins sind verschieden. MACHT und FARKAS³ fanden eine deutliche Verkürzung der GZ., sowohl bei Katzen als auch bei Menschen. HARNED *et al.*⁴ konnten eine Änderung der GZ. durch Aureomycin im Tierversuch nicht bestätigen, Ross *et al.*⁵ fanden auch bei Menschen keine Änderung.

Die folgenden Versuche sollen mit den klinisch gefundenen Ergebnissen nicht in eine Parallele gebracht werden, da es sich dabei um *in vivo* nie vorkommende, nur im Experiment verwendete ausserordentlich hohe antibiotische Konzentrationen handelt und ausserdem in den folgenden Untersuchungen nicht die GZ. an sich, sondern die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion beobachtet wurde. Dies deshalb, weil die GZ. einen Summeneffekt

aus vielen Einzelfaktoren darstellt, während wir in der im folgenden beschriebenen Versuchsanordnung nur die zweite Phase der Gerinnung beobachteten.

Versuchsanordnung

Eine Tüpfelplatte wird, wie bei der Bestimmung der Prothrombinzeit, im Wasserbad auf 37° gehalten. Darauf kommen:

0,1 Zitratplasma,

0,1 physiologische Kochsalzlösung mit Zusatz steigender Mengen des Antibiotikums,

0,1 Thrombinlösung (1 NIH-E/cm³).

Es wird die Zeit vom Zusatz der Thrombinlösung bis zum Auftreten des ersten Fibrinfadens gemessen. Sie beträgt beim Leerwert (ohne Antibiotikum) 44 s.

Abbildung 1 zeigt die typischen Kurven, die die drei Antibiotika bei dieser Versuchsanordnung geben. In Dosen, die dem therapeutischen Blutspiegel entsprechen, ist ein Einfluss von Penicillin, Streptomycin und Aureomycin auf die GZ. nicht zu beobachten.

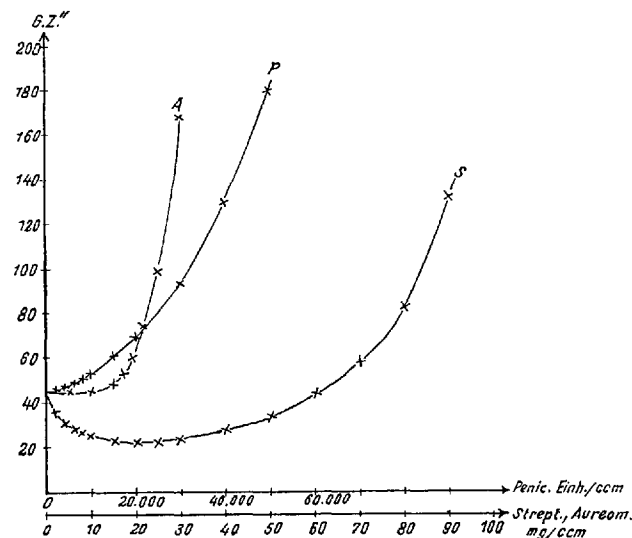


Abb. 1. Verhalten der Thrombin-Fibrinogen-Reaktion bei Zusatz von Penicillin, Streptomycin und Aureomycin in verschiedenen Konzentrationen.

(Durchschnitt aus 3 Einzelbestimmungen.)

In höherer Dosierung kommt es bei Penicillin zu einer zunehmenden Verlängerung der GZ.

Streptomycin verkürzt die Gerinnung in Dosen, die weit höher liegen als die therapeutisch erreichbaren. Bei weiterer Zunahme der Konzentration kommt es auch hier zu einer Verlängerung der GZ.

Aureomycin zeigt zunächst ziemlich lange keinen Einfluss, um dann plötzlich eine starke Verzögerung der Gerinnung hervorzurufen.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der oben angeführten Verkürzung der GZ. bei therapeutischer Penicillin- und Streptomycinanwendung. Diese klinisch gefundene Verkürzung kann demnach entweder durch eine Beeinflussung eines Faktors der ersten Gerinnungsphase zustande kommen, die bei unserer Methode (Messung der zweiten Phase) nicht erfasst wurde, oder es kommt durch die Körperpassage zu einer Veränderung der Antibiotika, die *in vitro* nicht darstellbar ist.

Die Ursachen dieser Gerinnungsverlängerung könnten liegen:

1. in einer Änderung des pH,
2. in einer Denaturierung des Fibrinogens,
3. in einer Schädigung des Thrombins.

¹ L. F. MOLDAVSKY, W. B. HASSELBROOK und G. D. CATENO, Science 102, 38 (1945).

² D. J. MACHT, Science 105, 213 (1947).

³ D. J. MACHT und R. FARKAS, Science 110, 305 (1949).

⁴ B. K. HARNED, R. W. CUNNINGHAM, M. C. CLARK, R. COSGROVE, C. H. HINE, W. J. McCauley, E. STOEKEY, R. E. VESSEY, N. N. YUDA und Y. SUBBAROW, Ann. New York Acad. Sci. 51, 182 (1948).

⁵ S. ROSS, F. G. BURKE, E. C. RICE, E. B. SCHOENBACH, H. BISCHOFF und J. A. WASHINGTON, Clin. Proc. Child. Hosp. 4, 315 (1948).