

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 Fibrinfilmcs 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.

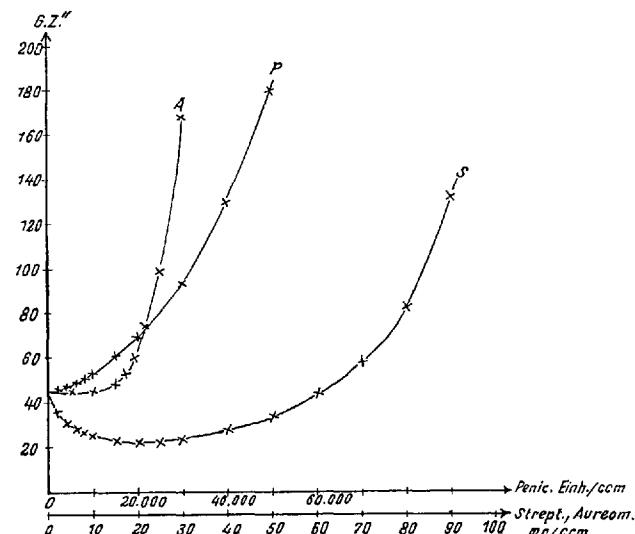


Abb. 1. Verhalten der Thrombin-Fibrinogen-Reaktion bei Zusatz von Penicillin, Streptomycin und Aureomycin in verschiedenen Konzentrationen.

(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. COGROVE, C. H. HINE, W. J. McCUALEY, E. STOCKEY, 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).

Verhalten der GZ. (aus Kurve 1) und des Fibrinogens bei verschiedenen Konzentrationen der Antibiotika (Durchschnittswerte aus 3 Bestimmungen).

Antibiotische Konzentrationen/cm ³		0	10 mg (10000 E)	20 mg (20000 E)	30 mg (30000 E)	50 mg (50000 E)
Penicillin	GZ.	44	52	68	94	180
	Fibrinogen mg%	337	332	337	335	283
Streptomycin	GZ.	44	24	23	26	34
	Fibrinogen mg%	337	339	334	337	296
Aureomycin	GZ.	44	44	60	160	—
	Fibrinogen mg%	337	336	332	252	—

Ad 1: pH-Messungen bei den höchsten angewandten Konzentrationen der Antibiotika zeigten niemals Werte unter 6,6. Da aber nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen von ZANDT, HAWN und PORTER¹ die Fibrinbildung im pH-Bereiche von 6,3–8,5 nicht gestört ist, kommt die pH-Änderung als Ursache nicht in Frage.

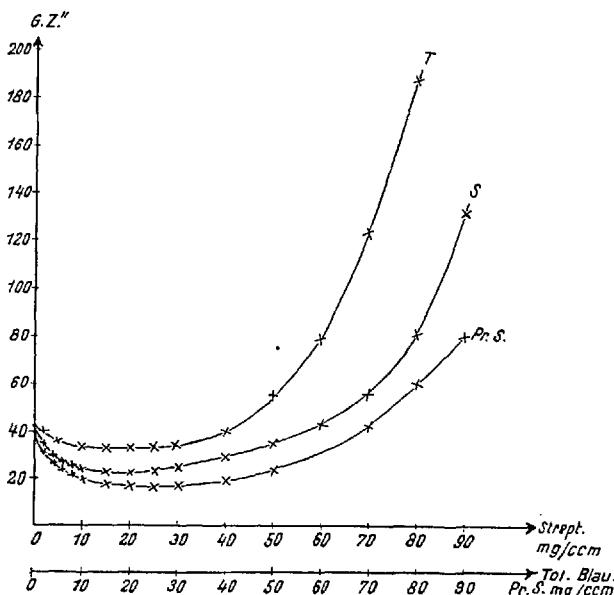


Abb. 2. Einfluss von Streptomycin (S) auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion im Vergleich zu Toluidinblau (T) und Protaminsulfat (Pr.S.) (Durchschnitt aus 3 Einzelbestimmungen.)

Ad 2: Bei zunehmender Verlängerung der GZ. kam es in den Versuchen zur Bildung einer wesentlich zarteren Fibrinflocke als beim Leerversuch. Quantitative Fibrinbestimmungen mit der Methode der feuchten Veraschung nach KJELDAHL ergaben dementsprechend bei höheren Konzentrationen der Antibiotika eine mässige Abnahme des koagulierbaren Fibrinogens (Tabelle).

Da aber eine Fibrinogenabnahme nach Untersuchungen von FRICK², FRITSCHY³, WÖHLISCH⁴ und anderen bis zu Werten von etwa 30 mg% nur auf die Konsistenz des Gerinnsels Einfluss nimmt und erst darunter auf die GZ., kann sie in unseren Versuchen für deren Verlängerung nicht verantwortlich gemacht werden.

¹ C. V. ZANDT HAWN und K. R. PORTER, J. Exp. Med. 86, 285 (1947).

² P. FRICK, Helv. Med. Acta 15, 6 (1948).

³ W. FRITSCHY, Diss. Zürich, 1945.

⁴ E. WÖHLISCH, Erg. Physiol. 28, 531 (1935).

Ad 3: Nach Ausschluss der beiden anderen Möglichkeiten muss deshalb angenommen werden, dass es zu einer Schädigung des Thrombins durch die hohen Konzentrationen der Antibiotika kommt.

Erklärungsbedürftig bleibt das abweichende Verhalten der Streptomycinkurve. Diese ist nun fast identisch mit der Änderung der GZ. unter Einwirkung von Toluidinblau (Abb. 2). Bei beiden Kurven kommt es (im Gegensatz zu denen der anderen geprüften Antibiotika) zuerst zu einer Verkürzung der GZ., erst später zu einer Verlängerung. Als Erklärung dafür wird vom Toluidinblau angenommen, dass es in niederen Konzentrationen die Antithrombina inaktiviert, in höheren Konzentrationen das Thrombin blockiert (FRITSCHY¹, GRUNKE²). Den gleichen Mechanismus müssen wir vom Streptomycin annehmen. Einen ähnlichen Verlauf zeigt auch die Gerinnungskurve bei Zusatz steigender Mengen von Protaminsulfat.

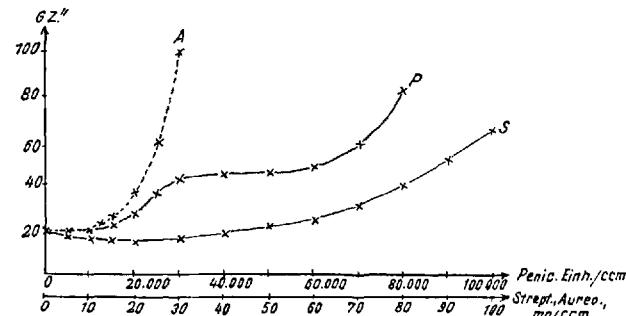


Abb. 3. Aufhebung bzw. Verzögerung der Thrombinblockierung durch Protaminsulfat. P = Penic. Einh./ccm, S = Streptomycin, A = Aureomycin. (Durchschnitt aus 3 Einzelbestimmungen.)

Der Einfluss von Protaminsulfat auf die durch Antibiotika verlängerte Gerinnungszeit

Bei verschiedenen Versuchen, die Thrombinblockierung aufzuheben, fanden wir im Protaminsulfat ein wirksames Mittel. Der als Antiheparin bekannte Stoff führt schon bei Zusatz zu Zitratplasma ohne Antibiotikum zu einer Verkürzung der GZ.

Wir haben zunächst, um die optimale Konzentration zu ermitteln, Protaminsulfat in verschiedenen Verdünnungen dem normalen Zitratplasma zugesetzt. Es wurde dann die GZ. mit Thrombin bestimmt, die bei 0,001 Protaminsulfat/cm³ eine Gerinnungsverkürzung von 44 s auf 20 s erreicht hatte (siehe Abb. 2). Da die Verkürzung

¹ W. FRITSCHY, Diss. Zürich, 1945.

² W. GRUNKE, Exp. Med. 107, 306 (1940).

der GZ. bei weiterer Steigerung der Protaminsulfatkonzentration nur noch geringgradig zunahm, verwendeten wir die angegebene Dosierung für alle folgenden Versuche.

Die Thrombinaktivierung der Antibiotika konnte durch Protaminsulfat beträchtlich vermindert werden (Abb. 3). So findet sich vor allem bei Penicillinkonzentrationen, die sonst das Plasma bei Zusatz der verwendeten Thrombinmenge praktisch ungerinnbar machen, eine kaum verlängerte GZ.

Aureomycin bildet hier eine Ausnahme, da es bei Zusatz von Protaminsulfat nicht zur normalen Gerinnung, sondern zur Ausfällung kleiner, nicht zusammenhängender Flocken kommt (strichlierte Kurve).

Das Protaminsulfat hat also, neben seiner Eigenschaft, Heparin zu inaktivieren, auch einen Einfluss auf die thrombinhemmende Wirkung der Antibiotika, die es innerhalb einer gewissen Konzentration aufzuheben vermag.

Diese Tatsache wirft eine Reihe von Problemen auf:

1. Es handelt sich bei der verkürzenden Wirkung des Streptomycins und des Protaminsulfats auf die GZ. um zwei verschiedene Wirkungsmechanismen. Beide zusammen haben eine stärkere Wirkung auf die Antithrombine als jedes für sich allein (siehe Abb. 2). Dementsprechend wird die Gerinnung bei Zusatz von Streptomycin plus Protaminsulfat zu Plasma stärker verkürzt als bei Zusatz der für die Gerinnungsverkürzung optimalen Protaminsulfatkonzentration.

2. Der eigenartig wellenförmige Verlauf der Penicillinkurve, der nach einem anfänglichen Anstieg keine Änderung der GZ. zwischen 30000 und 60000 Einheiten Penicillin/cm³ erkennen lässt, spricht ebenfalls für zwei getrennt zur Wirkung kommende Faktoren der Thrombinaktivierung.

3. Völlig ungeklärt ist die Tatsache, dass Aureomycin in höherer Dosierung eine kompakte Gerinnung verhindert.

F. MLCZUCH und H. VINAZZER

II. medizinische Klinik der Universität Wien, den 15. Oktober 1951.

Summary

The influence of penicillin, streptomycin and aureomycin on the second phase of coagulation has been examined. The following results have been found:

(1) Doses which are adequate to the therapeutic blood level do not influence the thrombin-fibrinogen reaction *in vitro*.

(2) Doses which highly exceed the therapeutic blood level considerably prolong the thrombin-fibrinogen reaction by blocking thrombin.

(3) This thrombin-blocking effect of antibiotics is suppressed by protamin sulphate up to a certain concentration.

Antidiuretic Action of Small Doses of Enteramine Extracts in the Rat

II. Extracts of *Discoglossus pictus*' skin

In a previous report¹ the antidiuretic action displayed in rats by small doses of acetone extracts of posterior salivary glands of *Octopus vulgaris* was described, and the mechanism of this action discussed.

In the present researches, which complete the preceding ones, acetone extracts of *Discoglossus pictus*' skin were used. This material is very rich in enteramine; just

as rich, or nearly so, as the salivary extracts of *Octopus vulgaris*¹, over which it has the great advantage of being free of tyramine, of octopamine, and, apparently, also of other substances interfering with the antidiuretic action of enteramine.

The methods here employed correspond to those previously described: to the study of PAI (*p*-aminohippuric acid) and thiosulphate renal excretion, we have added that of creatinine excretion.

Our experimental procedure allows us to ascertain, with satisfactory accuracy, the absolute and relative values of urine flow, and also to obtain reliable information on the relative changes of glomerular filtration rate and renal plasma flow in animals treated with *Discoglossus* extract, as compared to controls.

The following doses of *Discoglossus* extract (expressed in fresh tissue) were injected subcutaneously, immediately after the second water load (5 cm³/100 g) was given by stomach tube: 0.001 g, 0.01 g, and 0.1 g per 100 g rat.

At the same time, still subcutaneously, the following test substances were administered: PAI 50 mg/kg (effective renal plasma flow), sodium thiosulphate 500 mg/kg or creatinine 200 mg/kg (glomerular filtration rate).

Diuresis was closely followed for 7 h. The concentration of test substances was estimated in samples of urine collected after 60 min, 90 min, 2 h, 3 h, and 7 h. For the smallest dose of *Discoglossus* extract only the urine flow was recorded.

The *Discoglossus* material we investigated, obtained from about 1000 animals (Sicily, March 1951), leaves a total dry residue of 17.4 mg per gram fresh tissue. Its acute toxicity in rats is very low: a subcutaneous injection of the extract corresponding to 10 g fresh tissue/100 g body weight allows all treated animals to survive.

The table shows the percent excretion of water and test substances in the with *Discoglossus* extract treated groups, when compared to the excretion in the control groups, arbitrarily considered = 100. Absolute excretion values, from which these data are calculated, will be reported in the work *in extenso*.

The conclusions we can draw from the results set down in the table are quite similar to those reported in our preceding communication²:

(1) The extract of *Discoglossus pictus*' skin constantly causes, in hydrated rats, a remarkable reduction of the urine flow. The antidiuretic action is roughly proportional to the amount of extract administered. Using our experimental methods, the smallest dose of extract still active on the diuresis corresponds to 1 mg fresh skin/100 g body weight.

In the work *in extenso* we shall demonstrate that the antidiuretic action of the *Discoglossus* extract is exclusively, or nearly so, due to its enteramine content. Probably such content is about 1/1000, when referred to fresh tissue: this means that a quantity of pure enteramine as little as 1 µg/100 g body weight is sufficient to reduce, in a significant manner, diuresis in rats.

Experiments carried out with pure enteramine (= 5-hydroxytryptamine) and with synthetic enteramine-like derivatives, have confirmed these data of sensitivity and have also confirmed that, in rats, the smallest active dose of enteramine is at least 5000–10 000 times lower than the lethal dose.

(2) The reduction of urine flow is invariably accompanied by a conspicuous reduction of renal excretion of

¹ V. ERSPAMER and M. VIALLI, *Nature* 167, 1033 (1951).

² V. ERSPAMER and A. OTTOLENGHI, *Exper.* 8, 31 (1952).