

30–50/s (SMITH<sup>1</sup>, LINDSLEY<sup>2</sup>, and others). REID<sup>3</sup> found comparable rates of frequency in the reflex contractions of the extraocular muscle in cat.

In pathological conditions exhibiting varying degrees of paresis, it is possible to show whether the paralysis is complete or partial. If the cause is a peripheral motor neurone disorder there will be a considerable reduction in the number of action potentials. The spontaneous fibrillations of the denervated muscle are, however, difficult to distinguish from the motor unit activity which in the eye has the same amplitude and duration as the ordinary fibrillation potentials. The fibrillation potentials may, however, be distinguished by their lower frequency, irregular rhythm and independence of voluntary contraction.

Some of this work has been done together with KUGELBERG. The paper forms part of a more extensive study in the process of being prepared.

Ä. BJÖRK

Department of Clinical Neurophysiology, Serafimerlasarettet, Stockholm, March 5, 1952.

### Zusammenfassung

Es gelang, die elektrische Aktivität der äusseren Augenmuskeln beim Menschen zu registrieren. Die Aktionspotentiale dieser Muskeln sind ungleich denen des Rumpfes und der Extremitäten. Amplitude und Dauer sind wesentlich geringer, während die Frequenz einzelner Potentiale sehr hohe Werte erreicht.

<sup>1</sup> O. C. SMITH, Amer. J. Physiol. 108, 629 (1934).

<sup>2</sup> D. B. LINDSLEY, Amer. J. Physiol. 114, 90 (1935).

<sup>3</sup> G. REID, J. Physiol. 110, 217 (1949).

## Aktivierung der Hämolyse und Hämagglutination durch Papain

Ein Beitrag zum Nachweis inkompletter Rhesus-Antikörper

Trypsin hat die Eigenschaft, Erythrozyten des Menschen so zu verändern, dass sie unter homologen Bedingungen von inkompletten Anti-Rhesus-Antikörpern in NaCl-Lösung zusammengeballt werden. Der Titer von Iso- und Immunagglutininen ist ein höherer gegenüber roten Blutkörperchen, welche mit Trypsin zusammengebracht waren. Die Befunde stammen von MORTON und PICKLES<sup>1</sup> und wurden von verschiedener Seite<sup>2, 3, 4</sup> bestätigt.

Um zu entscheiden, ob die von MORTON und PICKLES gemachte Beobachtung nur für spezifische Hämagglutinine gilt und nicht auch für ähnlich wirkende Körper, welche mit Erythrozyten und andern Antigenen reagieren, wurden folgende Versuche ausgeführt.

Zunächst prüften wir, ob mit Agglutininen verwandte oder identische Hämolytine nach fermentativer Vorbehandlung von Erythrozyten ein aktiveres Verhalten zeigen. Als Enzym benutzten wir das von KUHN und BAILEY<sup>5</sup> für den Nachweis inkompletter Rh-Antikörper

empfohlene Papain<sup>1</sup>, das wir mit Phosphatpuffer von pH 5,9 in zweiprozentige Lösung brachten. Von dem Ferment gaben wir 1 cm<sup>3</sup> zu 4 cm<sup>3</sup> einer fünfprozentigen Suspension gewaschener Meerschweinchen-Erythrozyten, hielten das Gemisch 60 min bei 37°C, zentrifugierten es ab, wuschen es zweimal mit der zwanzigfachen Menge des Sedimentes und füllten es auf das ursprüngliche Volumen auf. Anschliessend wurden halbschlächliche Verdünnungen von Menschenserum hergestellt, in welche wir zu gleichen Teilen die präparierten Blutkörperchensuspensionen einfüllten. Als Kontrolle diente eine Meerschweinchen-Erythrozyten-Suspension ohne Papain. Bei der Ablesung nach 45minütigem Aufenthalt bei 37°C ergab sich, dass der Endtiter mit vollständiger Hämolyse bei den mit Ferment vorbehandelten Blutkörperchen 1:32 betrug, während in dem Kontrollversuch eine Serumkonzentration von 1:8 für die komplette Auflösung der Erythrozyten erforderlich war. Bei der Wiederholung des Experimentes unter gleichen Bedingungen mit einem andern Serum war der Endwert bei den mit Enzym zusammengebrachten Blutkörperchen 1:64 und der Endtiter bei den nicht vorbehandelten Erythrozyten 1:8.

Auch das Hämolytine von Schlangengiften wies eine Aktivitätszunahme gegenüber Papain modifizierten Meerschweinchenerythrozyten auf. Das Toxin von *Sepeidon Hämachetes* (Ringhals)<sup>2</sup> vermochte nach 90minütigem Einwirken bei 37°C auf nicht vorbehandelte Meerschweinchenblutkörperchen in der Verdünnung von 1:1000 keine Hämolyse herbeizuführen, während die gleiche Dilution Erythrozyten nach vorhergehender Behandlung mit Papain partiell zu lösen imstande war. Das Gift von *Viper Russellii* hämolysierte Meerschweinchenerythrozyten in der Verdünnung von 1:8000, aber Blutkörperchen, die mit zweiprozentigem Papain zusammengebracht waren, ebenso stark in einer Dilution von 1:20000 und in schwächerem Grade in einer Verdünnung von 1:40000.

Ähnliche Ergebnisse erhielten wir, als wir agglutinierendes Ricin (aus *Ricinus communis*) auf mit Papain präparierte Erythrozyten einwirken liessen. Wurden mit dem Ferment inkubierte Blutkörperchen des Menschen der Gruppe Null mit fallenden Dilutionen des Phytotoxins zusammengebracht, so war innerhalb von 45 min eine starke Zusammenballung in den Verdünnungen von 1:160000 zu verzeichnen; der entsprechende Titer bei den Erythrozyten ohne Papain war 1:20000. – Meerschweinchenblutkörperchen zeigten nach Kontakt mit dem Ferment gegenüber Ricin ein analoges Verhalten, indem der Papaintiter 1:160000 und der Normaltiter 1:40000 betrug.

Inkomplette Rhesus-Antikörper agglutinierten in NaCl-Lösung Rh-positive Blutkörperchen, wenn diese mit zweiprozentigem Papain (1 Teil Enzymlösung + 4 Teile Erythrozytensuspension) behandelt und anschliessend gewaschen waren. Die Zusammenballung war von der gleichen Stärke, wie wir sie bei Trypsinblutkörperchen in der Versuchsanordnung von MORTON und PICKLES sahen. Papain ist also in ähnlicher Weise wie Trypsin entsprechend den Angaben von KUHN und BAILEY (l. c.) zum Nachweis inkompletter Rh-Antikörper geeignet.

<sup>1</sup> Präparat: Papayotinum 1:80, Merck.

<sup>2</sup> Schlangengifte wurden uns freundlicherweise überlassen von Herrn Prof. E. GRASSET (Institut d'hygiène, Genf), Ricin von Herrn Dr. S. SEIDENBERG (Hygienische Anstalt, Basel) und Bienengifte von den Firmen Siegfried AG. (Zofingen) und F. Hoffmann-La Roche & Co., AG. (Basel).

<sup>1</sup> J. A. MORTON und M. M. PICKLES, Nature 159, 779 (1947).

<sup>2</sup> P. L. MOLLISON, A. E. MOURANT und R. R. RACE, The Rh Blood Groups and their Clinical Effects., Med. Res. Council, Memorandum Nr. 19, London 1948.

<sup>3</sup> W. E. WHEELER, M. L. L. SCOLL und A. L. LUHBY, Health Center J. (Ohio State University) 2, 86 (1949).

<sup>4</sup> W. E. WHEELER et al., J. Immunology 65, 39 (1950).

<sup>5</sup> W. J. KUHN und A. BAILEY, Amer. J. clin. Path. 20, 1067 (1950).

Ausserdem vermochten wir in einem uns zur Verfügung stehenden Fall von Viruspneumonie den Titer der *Kälteagglutination* von 1:128 auf 1:512 zu erhöhen. Die Sensibilisierungszunahme der Erythrozyten manifestierte sich ferner darin, dass diese im Gegensatz zu normalen Blutkörperchen in schwachem Masse auch bei 37°C agglutiniert wurden.

Die Empfindlichkeitssteigerung roter Blutkörperchen durch das von uns benutzte Ferment ist keine generelle in dem Sinne, dass alle Stoffe, welche mit Erythrozyten reagieren, eine Verstärkung zeigen. Bienengifthämolyse, geprüft gegenüber Erythrozyten des Menschen, konnten von uns bis jetzt durch das beschriebene Verfahren nicht intensiviert werden, ebenso wenig wie Hämolyse von Streptokokken und Staphylokokken. Wechselnde Resultate wurden erhalten mit einem durch Autolyse gewonnenen Hämolsin von Paratyphus-B-Bazillen. Negative Ergebnisse waren bis jetzt bei den Kombinationen Erythrozyten+Influenzabazillen (Hirst-Test) und Paratyphus-B-Bazillen+spezifischem Immuns serum zu verzeichnen. Auch WHEELER und Mitarbeiter erwähnen Beispiele für das Ausbleiben von Titererhöhungen bei Verwendung trypsinmodifizierter Erythrozyten und bei Prüfung mit Antiseren gegen verschiedene Blutgruppenantigene.

E. BERGER

Rhesus-Laboratorium des Kinderspitals Basel, den 10. März 1952.

Summary

- (1) Papain causes the red blood corpuscles to undergo an increase in sensitivity to serum haemolysines, haemolysing snake venoms and agglutinating phytotoxins.
- (2) Papain is suitable for the demonstration of incomplete Rhesus antibodies.
- (3) Ferments like trypsin and papain produce a change in the erythrocytes which can be demonstrated by the action of haemolysines and haemo-agglutinines of various sorts.

Über die Hemmung der Arginase durch Stickstofflost

In der Literatur wird verschiedentlich berichtet, dass Stickstofflost die Arginaseaktivität nicht beeinflusse<sup>1</sup>. Zwar gehen die Meinungen über die Bedeutung von Sulfhydrylgruppen für die Arginaseaktivität auseinander<sup>2</sup>, so dass nicht von vornherein die Hemmbarkeit durch Lost vermutet oder abgelehnt werden kann, doch haben wir bei Einhaltung geeigneter Versuchsbedingungen eine vollständige Hemmung der Arginaseaktivität erzielen können, über die im folgenden kurz berichtet sei.

Die Reaktion von Lostverbindungen mit Proteinen bzw. ihren reaktiven Gruppen benötigt eine gewisse Zeit und ein pH dicht am Neutralpunkt; zugleich zur Vermeidung einer Enzymdenaturierung durch frei werdende HCl inkubieren wir daher die zu untersuchende Fermentlösung vor Beginn des Versuches 2 Stunden bei 37°, während auf pH 7 gepuffert ist. Je nach dem pH-Optimum des zu untersuchenden Enzyms wird nach 2 Stun-

den das neue pH eingestellt. Zur Untersuchung der Arginase gingen wir so vor, dass die Fermentlösung mit Lost (bzw. mit Wasser zur Kontrolle) und der berechneten Menge Glykokollösung versetzt wurde; nach zwei Stunden wurde dann die zur Einstellung von pH 9,5 erforderliche Menge NaOH zugegeben. Die Versuche wurden im übrigen, wie früher beschrieben<sup>1</sup>, durchgeführt.

Wie die Tabelle I zeigt, wird die Arginaseaktivität durch Tris-( $\beta$ -chloräthyl)-aminhydrochlorid vollständig gehemmt.

Tabelle I  
Arginasehemmung durch Stickstofflost  
( $\gamma$ gespaltenes Arginin, berechnet aus N-Zuwachs nach Urease-Einwirkung)

|                                   | Nach<br>5 min | Nach<br>20 min | % Hemmung |
|-----------------------------------|---------------|----------------|-----------|
| Kontrolle . . . . .               | 1310          | 2090           | 100 100   |
| N-Lost $6,2 \cdot 10^{-4}$ m . .  | 0             | 0              |           |
| Kontrolle . . . . .               | 1150          | 2120           | 100 100   |
| N-Lost $4,6 \cdot 10^{-4}$ m . .  | 0             | 0              |           |
| Kontrolle . . . . .               | 1140          | 1980           | 100 92    |
| N-Lost $4,25 \cdot 10^{-4}$ m . . | 0             | 160            |           |
| Kontrolle . . . . .               | 1100          | 2060           | 59 47     |
| N-Lost $3,1 \cdot 10^{-4}$ m . .  | 480           | 1100           |           |
| Kontrolle . . . . .               | 1190          | 2140           |           |
| N-Lost $2,3 \cdot 10^{-4}$ m . .  | 1190          | 2170           | 0 0       |

Versuche mit  $1,5 \cdot 10^{-4}$  m sowie  $6,2 \cdot 10^{-5}$  m ergaben ebenso wie mit  $2,3 \cdot 10^{-4}$  m (siehe Tabelle I) keine Hemmung mehr. In Kontrollversuchen fand sich mit den Lostmengen, die bei der Analyse mit Urease maximal auf dieses Enzym einwirken können, kein Einfluss auf dieses Enzym, so dass eine Störung der Analysenmethode durch Lostverwendung nicht erfolgt, wie Tabelle II zeigt.

Tabelle II  
Ureaseaktivität in Gegenwart von Stickstofflost ( $\gamma$ gespaltenen Harnstoff, berechnet aus N-Zuwachs)

|                                  | Nach<br>5 min | Nach<br>20 min | % Hemmung |
|----------------------------------|---------------|----------------|-----------|
| Kontrolle . . . . .              | 51            | 24             | —         |
| N-Lost $6,3 \cdot 10^{-4}$ m . . | 50            | 25             | —         |

Auch an isolierten Zellkernen, die bekanntlich Arginase enthalten<sup>1</sup>, liess sich die Arginasehemmung durch Stickstofflost erweisen, allerdings in etwas geringerem Ausmass als beim dialysierten Leberhomogenat, was wohl auf die Permeabilitätsverhältnisse der nach LANG und SIEBERT<sup>2</sup> in stark hypertonischer Lösung gewonnenen Zellkerne zurückzuführen ist; siehe Tabelle III.

Wurde die Vorbehandlung der Enzymlösung mit Lost abgewandelt, so war keine Hemmung erreichbar; weder reagierte das Fermentprotein bei pH 9,5 mit Stickstofflost in merklichem Ausmass, noch zeigte bei pH 7 mit Lost inkubierte Fermentlösung eine Hemmung, wenn die nachfolgende Messung der Arginaseaktivität bei pH 7

<sup>1</sup> E. S. G. BARRON, G. R. BARTLETT und Z. B. MILLER, J. exp. Med. 87, 489 (1948). – G. R. MCKINNEY, J. Pharmacol. exp. Therap. 101, 345 (1951).  
<sup>2</sup> S. EDLBACHER, J. KRAUS und G. WALTER, Z. physiol. Chem. 206, 65 (1932). – E. WALDSCHMIDT-LEITZ, A. SCHÄFFNER und R. KOCHOLATY, Naturwiss. 19, 964 (1931). – D. M. GREENBERG und SUMNER-MYRBÄCK, The Enzymes, Vol. I (Acad. Press, New York 1951).

<sup>1</sup> K. LANG, G. SIEBERT, S. LUCIUS und H. LANG, Biochem. Z. 321, 538 (1951).  
<sup>2</sup> K. LANG und G. SIEBERT, Biochem. Z. 322, 360 (1952).