

cles de Lapin, préparés au moyen de solutions d'extraction de force ionique $\geq 0,5$. Il correspond à une fraction protéinique, isolée par l'auteur, soluble à faible force ionique ($\mu 0,05$), mais insoluble dans l'eau distillée. La méthode d'isolation consistait à isoler, de l'extrait total, une fraction précipitant à 35 % de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, contenant la protéine Y et de l'actomyosine, puis en dialysant ce mélange contre une solution de $\mu = 0,05$ (0,016 m Na_2HPO_4 – 0,002 m NaH_2PO_4) : la protéine Y reste en solution, tandis que l'actomyosine précipite.

Cette méthode présente des difficultés : souvent après dialyse, l'analyse électrophorétique montre, qu'en plus de la protéine Y, il subsiste le plus souvent une certaine quantité d'actomyosine.

Nous avons obtenu de meilleurs résultats en précipitant d'abord l'actomyosine avec les autres myosines en diluant l'extrait initial et en précipitant ensuite la fraction Y restée dans le liquide surnageant par le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 35 % de saturation.

Technique. Les muscles de Lapin sont prélevés immédiatement après la mort de l'animal et introduits dans une enceinte à -20°C . On évite ainsi l'apparition du *rigor mortis* ainsi que des phénomènes de fatigue ou de contracture¹. Après avoir haché les muscles au microtome automatique à congélation en tranches de 40μ d'épaisseur, on extrait la pulpe pendant 10 min avec 5 volumes d'une solution de WEBER-EDSALL (KCl 0,6 m, NaHCO_3 0,04 m, Na_2CO_3 0,01 m). L'extraction et les opérations suivantes sont effectuées en chambre froide à environ 1°C . Après centrifugation, on ajoute 10 volumes d'eau distillée au liquide surnageant et on ajuste le pH à 6,3 à l'aide d'une solution d'acide acétique 1 N. On laisse déposer le précipité de myosines² pendant environ 2 h et on l'élimine par centrifugation (15 min à 2500 t/min). Le liquide surnageant est filtré sur laine de quartz et est amené ensuite à 35 % de saturation en sulfate ammonique par addition de 247,1 g de sel par litre de solution. A ce moment, le pH est d'environ 6. Le précipité est centrifugé, dissous par une solution de $\mu 0,40$ pH 7,4 (Na_2HPO_4 0,048 m – NaH_2PO_4 0,006 m – NaCl 0,25 m) et dialysé contre de l'eau distillée. La fraction Y précipite et après lavage est redissoute par une solution de $\mu 0,10$, pH 7,6 (Na_2HPO_4 0,032 m – NaH_2PO_4 0,004 m). On ajoute du sulfate ammonique jusqu'à 35 % de saturation, afin de purifier le produit par reprécipitation. On redissout le précipité et on le met en dialyse contre la solution tampon choisie pour l'analyse ($\mu 0,10$, pH 7,6 – $\mu 0,40$, pH 7,4).

Résultats. Les solutions contenant la fraction Y présentent un aspect opalescent ; elles ne sont ni visqueuses, ni biréfringentes par agitation. Soluble à $\mu 0,005$, pH 7,4, le produit précipite dans l'eau distillée (cfr. DUBUSSON³).

A l'analyse électrophorétique (méthode de TISELIUS-LONGSWORTH⁴), on ne trouve qu'un seul gradient dont la vitesse est, du côté ascendant :

- $2 \cdot 5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à $\mu 0,40$, pH 7,4,
- $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à $\mu 0,10$, pH 7,6,

et du côté descendant :

- $2,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à $\mu 0,40$, pH 7,4,
- $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à $\mu 0,10$, pH 7,6.

¹ M. DUBUSSON, Biochim. biophys. Acta 4, 25 (1950).

² J. P. GREENSTEIN et J. T. EDSALL, J. Biol. Chem. 133, 397 (1940).

³ M. DUBUSSON, Nature 116, 1116 (1950).

⁴ M. DUBUSSON, A. DISTÈCHE et A. DEBOT, Biochim. biophys. Acta 6, 97 (1950). – M. DUBUSSON et J. JACOB, Bull. Soc. roy. Sci. Liège, n° 3, 145 (1945).

Toutefois ce gradient s'étale de façon anormale, ce qui laisse supposer que la fraction n'est pas homogène (Fig. 1). Les clichés d'ultra-centrifugation¹ (Fig. 2) révèlent cette hétérogénéité qui est très grande : les préparations paraissent polydispersées et présentent trois gradients principaux qui ne constituent qu'une fraction de 22 % environ. Le plus important de ceux-ci est le moins rapide. Les vitesses de sédimentation de ces trois gradients sont $\approx 15, 8, 5$ unités SVEDBERG.

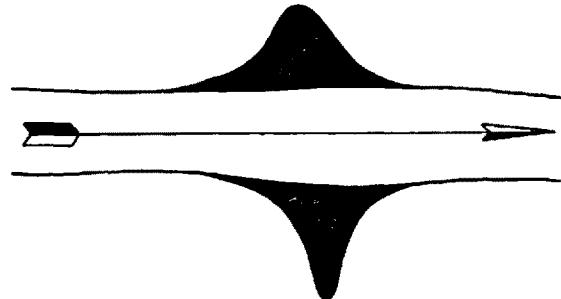


Fig. 1. Fraction Y après 20640 s d'électrophorèse à 4,12 V/cm, $\mu 0,10$, pH 7,6.

Le spectre d'absorption U.V. (spectrophotomètre de BECKMAN) du produit à $\mu 0,40$, pH 7,4, présente un minimum à $252 \text{ m } \mu$ et un maximum à $277,5 \text{ m } \mu$. La présence d'acide nucléique ou de nucléotide est donc exclue.



Fig. 2. Diagramme après 24 min d'ultra-centrifugation d'une solution de protéine Y de Lapin dans un tampon phosphatique $\mu 0,10$, pH 7,6. Concentration en protéines: 1,5 g/100 cm³ de solution. Vitesse: 59780 t/min.

En conclusion, le gradient électrophorétique Y est constitué par un mélange très hétérogène de globulines dont les propriétés électrocinétiques sont semblables et qui ne contiennent pas d'acide nucléique.

P. LOUIS

Laboratoire de biologie générale, Faculté des sciences, Université de Liège, le 22 janvier 1954.

Summary

The proteinic material corresponding to DUBUSSON's electrophoretic gradient has been prepared by a new method. This fraction migrates as a single peak in the U-tube, but is heterogeneous in the ultra-centrifugation.

¹ T. SVEDBERG et R. O. PEDERSEN, *The Ultracentrifuge* (Oxford University Press, 1940).

Die Wirkung von Aldosteron («Electrocortin») auf den Natrium-, Kalium- und Glykogen-Stoffwechsel des isolierten Muskels

Die Stoffwechselwirkungen des neu entdeckten Nebennierenrinden-Hormons, Aldosteron¹ («Electrocortin»²), haben wir am überlebenden Warmblütermuskel, dem

¹ S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. V. EUW, O. SCHINDLER und T. REICHSTEIN, Exper. 9, 833 (1953); 10, 132 (1954).

² W. SCHULER, P. DESAULLES und R. MEIER, Exper. 10, 142 (1954).

Diaphragma der Ratte, untersucht. Es wurde mit der Wirkung von 17-Oxycorticosteron («compound F») verglichen, weil dieses – neben Corticosteron – das hauptsächlich im Blut vorhandene Corticosteroid ist.

Wir benützen eine Technik, die andernorts¹ ausführlich beschrieben ist: Das Diaphragma von Ratten wird geteilt; die beiden seitlichen Teile, welche je rund 100 mg wiegen, kommen in 4 cm³ Ringer-Lösung, in welcher entweder ein Teil des Na durch Na²⁴, oder ein Teil des K durch K⁴² ersetzt ist. Das Muskelstück wird bei 37°C unter O₂ während 60 min in der Ringer-Lösung geschüttelt. Dabei tauscht das Na und K des Muskels mit dem entsprechenden Isotop der Ringer-Lösung aus. Nach Ablauf dieser Periode werden die Isotopen im veraschten Muskel unter dem Geiger-Rohr bestimmt.

Das eine Diaphragmasteck kommt in Ringer-Lösung ohne, das andere in solche mit Zusatz von 200 mg Glukose und 10 E Insulin pro 100 cm³. Das zweite Diaphragmasteck bildet intensiv Glykogen, während ohne Glukosezusatz das am Anfang im Muskel vorhandene Glykogen abgebaut wird. Wir bestimmen den Glykogengehalt am Anfang im vertebralem Mittelteil des Zwerchfells.

Die Wirkung der beiden Corticosteroide wurde sowohl ohne wie mit Zusatz von Glukose und Insulin geprüft. Die Steroide wurden in Äthylalkohol gelöst zugegeben, wobei die Alkoholkonzentration in der Ringer-Lösung 0,5 % betrug, was nicht stört².

Es stand uns 1 mg Aldosteron zur Verfügung, wovon zu jedem Muskel 10 γ pro 1 cm³ Ringer-Lösung (1 mg %) hinzugegeben wurde. Von 17-Oxycorticosteron wurde 100 γ je cm³ (10 mg %) benützt, weil uns bekannt war, dass kleinere Mengen noch keine deutlichen Effekte haben.

In der Tabelle sind alle Versuche zusammengestellt. Die in den Muskel eingetretenen Mengen von Na²⁴ und K⁴² sind als i.p.m. pro 100 mg Muskel berechnet. Die mittlere Abweichung vom Mittelwert $\epsilon = \sqrt{\sum d^2/[n(n-1)]}$ und der P-Wert (nach STUDENT) sind angegeben.

¹ E. FLÜCKIGER und F. VERZÁR, Helv. Physiol. Acta 12, 50 (1954).

² E. FLÜCKIGER und F. VERZÁR, Helv. Physiol. Acta 12, 57 (1954).

Während der Muskel in glukosefreier Ringer-Lösung 34–61 mg % Glykogen abbaut, wird in Gegenwart von Glukose und Insulin 263 mg % Glykogen gebildet. Die Tabelle zeigt, dass die Wirkung von Glukose auf den Na²⁴- und K⁴²-Austausch verschieden ist, indem sie den Na²⁴-Austausch vermindert, dagegen den K⁴²-Austausch nicht¹.

Aldosteron hat, wenn kein Glykogen gebildet wird, den Na²⁴-Austausch um 13,6 % erhöht, und den K⁴²-Austausch um ebensoviel vermindert. War jedoch Glukose vorhanden und wurde Glykogen gebildet, dann wurde sowohl der Na²⁴- als auch der K⁴²-Austausch vermindert. Die den Na²⁴-Austausch hemmende Glukosewirkung wurde durch Aldosteron noch verstärkt; die Aldosteronwirkung auf den K⁴²-Austausch wurde dagegen durch Glukose eher vermindert.

Vergleicht man diese Wirkungen mit jenen von 17-Oxycorticosteron², so zeigt sich, dass dieses in zehnfach höherer Konzentration zwar nicht ganz identisch, aber ähnlich und schwächer wirkt. Ohne Glukose ist eine Förderung des Na²⁴-Austausches nur angedeutet ($P < 0,3$), während die Förderung durch Aldosteron gesichert ist ($P < 0,01$). Ferner ist bei Gegenwart von Glukose der Na²⁴-Austausch nicht stärker vermindert als mit Glukose allein. Bezuglich des K⁴²-Austausches wirken in diesen Konzentrationen beide Corticosteroide ähnlich. Dieses Verhalten gegenüber dem Na²⁴-Austausch dürfte mit der Wirkung von 17-Oxycorticosteron auf den Glykogenstoffwechsel zusammenhängen, denn dieses zeigt noch einen Teil der Hemmungswirkung auf die Glykogenbildung, die besonders bei Desoxycorticosteron («Cortexon») ausgeprägt ist².

Zusammenfassend kann als bewiesen festgestellt werden, dass Aldosteron bereits in sehr geringer Konzentration (10 γ/cm³) die Permeabilität des Muskels für Natrium- und Kaliumionen vermindert, bei Gegenwart von Glukose bzw. Glykogenbildung. In Ringer-Lösung ohne Glukose wird Glykogen abgebaut, und der Effekt auf den Natriumaustausch ist umgekehrt.

¹ E. FLÜCKIGER und F. VERZÁR, Helv. Physiol. Acta 12, 50 (1954).

² E. FLÜCKIGER und F. VERZÁR, Helv. Physiol. Acta 12, 57 (1954).

Corticosteroid-Zusatz	Konzentration	Bestimmung	Zahl der Versuche	Ohne Glukose ¹	Mit Glukose ²	Mit Aldosteron	
						ohne Glukose ³	mit Glukose ⁴
Aldosteron	10 γ/cm ³ (= 1 mg %)	Na ²⁴ i.p.m.	8	817 ± 17,1	710 ± 21,8 -13,0% $P_{1,2} < 0,01$	928 ± 31,3 +13,6% $P_{1,3} < 0,01$	639 ± 28,9 -21,7% $P_{1,4} < 0,01$
		K ⁴² i.p.m.	8	534 ± 15,7	523 ± 13,4 -2% $P_{1,3} < 0,01$	469 ± 15,2 -13,6% $P_{1,4} < 0,01$	495 ± 10,6 -7,2% $P_{1,4} < 0,1$
		Glykogen mg %	4	-40	+263**	-61 +266	
17-Oxycorticosteron	100 γ/cm ³ (= 10 mg %)	Na ²⁴ i.p.m.	35	787 ± 21,0	693 ± 19,6 -12% $P_{1,2} < 0,01$	824 ± 26,5 +4,6% $P_{1,3} < 0,3$	685 ± 22,6 -13% $P_{1,4} < 0,01$
		K ⁴² i.p.m.	41	557 ± 10,9	554 ± 12,3 -0,3% $P_{1,3} < 0,01$	475 ± 11,0 -17,4% $P_{1,4} < 0,01$	516 ± 11,5 -7,3% $P_{1,4} < 0,02$
		Glykogen mg %	18	-34	+263**	-45 +184	

* Mit Glukose bedeutet: 200 mg und 10 E Insulin pro 100 cm³.
** Aus der früheren Arbeit Helv. Physiol. Acta 12, 57 (1954) entnommener Mittelwert.

** Aus der früheren Arbeit Helv. Physiol. Acta 12, 57 (1954) entnommener Mittelwert.

Mit 17-Oxycorticosteron in zehnmal höherer Konzentration sind alle diese Wirkungen ähnlich, aber schwächer.

Wir danken der Ciba-Aktiengesellschaft, Basel, für die Überlassung von Aldosteron und der Merck Inc., Rahway, für Compound F.

E. FLÜCKIGER und F. VERZÁR

Physiologisches Institut der Universität Basel, den 14. April 1954.

Summary

(1) The influence of Aldosterone ("Electrocortin") was compared with that of 17-oxycorticosterone (compound F). The exchange of Na^{24} and K^{42} with the electrolytes of muscle was studied, with or without the addition of glucose and insulin. The diaphragm of the rat in RINGER's solution was used.

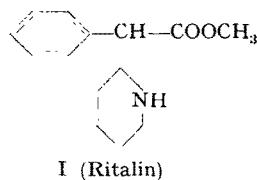
(2) Aldosterone (1 mg %) decreases the permeability of the muscle for Na^{24} and K^{42} if glucose and insulin are present, i.e. when glycogen is produced. Without glucose it increases Na^{24} exchange.

(3) 17-oxycorticosterone in ten times greater concentration (10 mg %) has similar, but somewhat less influence on the permeability.

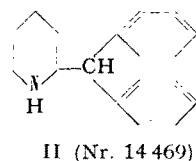
Zentralerregende Wirkung eines neuen Piperidinderivates¹

Vor mehreren Jahren befasste sich PANIZZON in unseren Laboratorien u.a. mit der Herstellung von Phenyl-pyridyl- und Phenyl-piperidyl-essigsäure-Derivaten², aus deren Reihe sich nach Befunden von R. MEIER, GROSS und TRIPOD der Phenyl-piperidyl-(2)-essigsäuremethylester (I), kürzlich in die Therapie als Ritalin eingeführt, als besonders zentralerregend erwies³. Im Zusammenhang mit Arbeiten über zyklische Alkylenimin-Derivate⁴ versuchten wir, weitere Piperidin-Abkömmlinge herzustellen. Dabei stiessen wir auf einen sehr stark wirksamen Verbindungstypus, nämlich den der 2-

(Diaryl-methyl)-piperidine¹, über den chemisch bzw. pharmakologisch andernorts ausführlicher berichtet werden soll. Wir beschränken uns hier auf die Beschreibung der Darstellung und pharmakologischer Eigenschaften des 2-Diphenylmethyl-piperidins der Formel II



I (Ritalin)



II (Nr. 14 469)

Nr. 14 469 unterscheidet sich von Ritalin dadurch, dass die Carbomethoxygruppe durch einen Phenylkern ersetzt ist, wodurch überraschenderweise die zentralerregende Wirkksamkeit wesentlich erhöht wurde.

Das neue Piperidin-Derivat erhielten wir in einfacher Weise durch Kondensation von Diphenyl-acetonitril mit 2-Brompyridin in Gegenwart von Natriumamid und Toluol. Das dabei in guter Ausbeute entstehende 2-(Diphenyl-cyanmethyl)-pyridin vom Smp. 123–125° liess sich leicht mit Schwefelsäure, unter gleichzeitiger Decarboxylierung zum 2-Diphenylmethyl-pyridin, verseifen. Durch Hydrierung in Gegenwart eines Nickelkatalysators wurde selektiv der Pyridinkern reduziert, und wir erhielten in guter Ausbeute das 2-Diphenylmethyl-piperidin. Die Verbindung ist eine starke Base, die bei 150–151° (0,01 mm) siedet und Kristalle vom Smp. 65–67° (aus Petroläther) bildet. Das Hydrochlorid wird in Form farbloser, wasserlöslicher Nadeln vom Smp. 286–287° erhalten; das Pikrat schmilzt bei 199–200°.

Das 2-Diphenylmethyl-piperidin-hydrochlorid zeigte bei der pharmakologischen Prüfung gewisse, sehr spezifische Wirkungen. Im Vordergrund steht ein ausgesprochener zentralerregender Effekt, welcher bei verschiedenen, nicht narkotisierten Tierarten (Maus, Ratte, Kaninchen und Hund) zuerst in allgemeiner Unruhe, später in hochgradiger koordinierter Motilitätssteigerung, Reflexsteigerung, Zwangsbewegungen und relativ geringer Atemerregung besteht. Je nach der Tier- bzw. Verabreichungsart tritt die typische psychomotorische Wirkung ab $1/50-1/20$ der akuten

¹ 8. Mitteilung über Alkylenimin-Derivate. 7. Mitteilung siehe B. M. ISELIN und K. HOFFMANN, J. Am. Chem. Soc. 76 (im Druck).

² L. PANIZZON, Helv. chim. Acta 27, 1748 (1944); 29, 324 (1946).

³ R. MEIER, F. GROSS und J. TRIPOD, Klin. Wschr. 32, 445 (1954).

⁴ 1. Mitteilung über Alkylenimin-Derivate, E. TAGMANN, E. SURY und K. HOFFMANN, Helv. chim. Acta 35, 1235 (1952).

¹ Unabhängig von uns haben vor kurzem B. B. BROWN und H. W. WERNER [Fed. Proc. 12, 1003 (1953); J. Pharmacol. 110, 180 (1954)] mitgeteilt, dass ein Derivat dieser Reihe, nämlich das 2-(Diphenyl-oxy-methyl)-piperidin, eine zentralerregende Wirkung vom Amphetamine Typus besitzt.

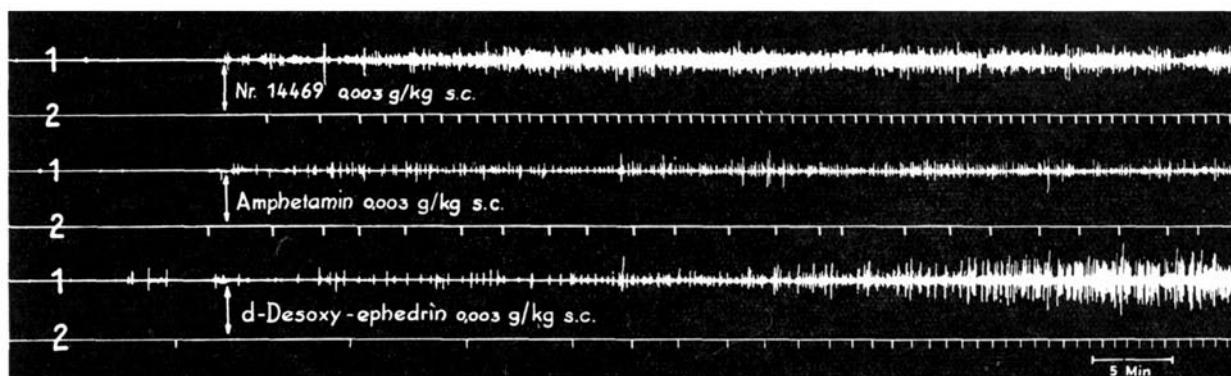


Abb. 1. Motilitätssteigerung an der Maus nach Nr. 14 469, Amphetamine und d-Desoxy-ephedrin 0,003 g/kg s.c.
1 = Direkte Registrierung der Bewegungen. 2 = Markierung von je 100 Bewegungen mit dem Totalisator.