

Sphingosineffekt und Thrombokinasen

Thrombokinasen aus	Nr.	Sphingosin in mm ³	Gerinnungszeiten des sphingosinhaltigen Plasmas mit					
			lipoidem Aktivator		Thrombokinasen		lipoidem Aktivator + Thrombokinasen	
			vor Inkubation	nach Inkubation	vor Inkubation	nach Inkubation	vor Inkubation	nach Inkubation
Rinderlunge	1 a)	30	3'05"	42"	1'18"	1'20"	53"	1'06"
	b)	60	3'28"	1'02"	2'01"	1'53"	1'13"	1'04"
Rinderlunge	2 a)	30	3'35"	58"	1'30"	1'08"	1'50"	1'06"
	b)	60	3'23"	1'09"	1'33"	1'41"	58"	1'00"
Menschliche Plazenta	3 a)	30	5'23"	55"	2'30"	1'19"	53"	44"
	b)	60	4'55"	1'00"	2'41"	2'13"	50"	55"
Menschliche Plazenta	4 a)	30	9'35"	1'45"	3'15"	1'58"	1'45"	1'33"
	b)	60	9'30"	2'18"	4'00"	2'25"	1'43"	1'39"
Kaninchenhirn (QUICK)	5 a)	30	4'00"	1'05"	10'55"	1'30"	6'30"	1'20"
	b)	60	4'25"	1'28"	13'00"	3'09"	5'00"	2'25"
Kaninchenhirn (QUICK)	6 a)	30	3'54"	1'13"	21'00"	1'49"	6'49"	1'14"
	b)	60	4'23"	1'15"	17'50"	1'26"	6'18"	1'08"

Zusammensetzung des Gerinnungsmediums. 150 mm³ Hühnerplasma, 30 (a) bzw. 60 mm³ (b) Sphingosin (5 mg/l cm³ H₂O) und 30 mm³ der jeweils angeführten Substanzen: lipoider Gerinnungsaktivator (6 mg/l cm³ NaCl), Thrombokinasen aus Rinderlunge (50 mg/l cm³ NaCl), aus menschlicher Plazenta (Handelsprodukt der Amsterdamschen Chininfabrik «A.C.F.»-50 mg/l cm³ NaCl) oder aus Kaninchenhirn nach QUICK (20 mg/l cm³ NaCl). Die Reaktionsmischungen wurden mit H₂O bzw. physiologischer NaCl-Lösung auf 270 mm³ gebracht. Technik der Gerinnungsbestimmungen nach HECHT¹.

ten lipoiden Aktivator². Auf die Möglichkeit einer Verwendung unserer Befunde zur Stützung der von TOCANTINS 1954 neuerdings in erweiterter Form mitgeteilten Theorie der Blutgerinnung³ kann an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden.

Der lipoiden Aktivator und Sphingosin könnten in geeigneten Mengenverhältnissen auch am Aufbau der «Plasmathrombokinasen» beteiligt sein. Immerhin entwickelt einerseits der lipoiden Aktivator mit sphingosininkubiertem Plasma eine Aktivität, die sonst nur den Thrombokinasen zukommt, und andererseits kann derselbe Effekt wie nach vorausgehender Plasma-Sphingosin-Inkubation durch gleichzeitige Zugabe von lipoidem Aktivator, Sphingosin und Thrombokinasen zu Plasma auch ohne Inkubation erreicht werden. Zudem ist entsprechend der Auffassung von HOWELL⁴ der lipoiden, thermostabile Aktivator der wesentliche Bestandteil der meist thermolabilen Thrombokinasen.

Endlich erachten wir es für möglich, dass bei vielen in der Literatur beschriebenen gerinnungsfördernden und -hemmenden Faktoren die wirksamen Stoffe mit den Komponenten der von uns mitgeteilten Reaktionen identisch sind.

E. HECHT

Physiologisch-chemisches Institut der Rijksuniversiteit Utrecht, Abt. Blutgerinnung, den 26. Mai 1954.

Summary

The reactions of the lipid activator and different thrombokinasen, both alone and together with sphingosine-containing plasma, are described. In connection with the results reported, the possible significance of the physiological substances for the physiopathology of blood clotting, and the generation of plasma thrombokinasen, is discussed.

Ricerche farmacologiche sui lisati di organi

VII. Azione dei lisati di muscolo sul cuore di Rana bloccato mediante la prima legatura di STANNIUS

Premesse. Praticando una legatura a qualsiasi livello degli atri del cuore di Rana, a partire dal punto di sbocco del seno venoso nell'atrio destro, fino al limite del solco atrio-ventricolare, si provoca l'arresto immediato dell'organo in tutte le parti sottostanti la legatura, mentre quelle sovrastanti continuano a pulsare con ritmo inalterato (prima legatura di STANNIUS). Se nel cuore così bloccato si pratica una seconda legatura, in corrispondenza del solco atrio-ventricolare, il ventricolo ricomincia a pulsare (seconda legatura di STANNIUS). Il fenomeno s'ottiene sia sul cuore isolato che *in situ*.

Le classiche esperienze dello Stannius sono troppo note perché ci si debba soffermare a illustrarle in dettaglio; d'altra parte, tutte le ipotesi avanzate per poter interpretare l'intimo meccanismo dei fenomeni non hanno resistito ad una critica rigorosa¹. Diremo soltanto che il blocco provocato dalla prima legatura è, generalmente, reversibile spontaneamente, per cui, dopo un periodo di arresto più o meno lungo, che può protrarsi fino a un'ora, le pulsazioni riprendono. Se, però, prima di operare la legatura, s'è provveduto a rimuovere ogni residuo di sangue, mediante un accurato lavaggio con liquido di RINGER, la riattivazione spontanea del cuore non s'ottiene, rimanendo esso inerte fino alla morte (SKRAMLIK²).

Da ricerche che da tempo andiamo conducendo (SCARINCI³; SCARINCI e ZARA⁴), sono emerse attività pecu-

¹ Per una dettagliata rassegna sull'argomento, vedasi la monografia del C. J. ROTHBERGER, in A. BETHE e G. BERGMANN, *Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie* (Julius Springer, Berlin 1926).

² E. SKRAMLIK, *Pflüger's Arch.* 183, 120 (1920).

³ V. SCARINCI, *Arch. int. Pharmacodyn.* 82, 365 (1950).

⁴ V. SCARINCI e E. ZARA, *Arch. Sci. biol.* 37, 388 (1953); *ibid.*, in stampa.

¹ E. HECHT, *Acta med. Scand.* 102, 79 (1939).

² E. HECHT, *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* 2, 134 (1951).

³ L. M. TOCANTINS, *Blood* 9, 281 (1954).

⁴ W. H. HOWELL, *Amer. J. Physiol.* 31, 1 (1912).

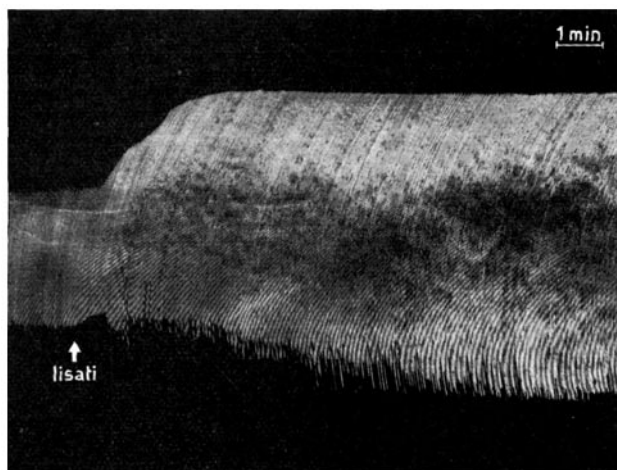


Fig. 1. Cuore isolato di Rana perfuso secondo STRAUB; alla freccia, s'inizia la perfusione con una soluzione di lisati di muscolo (2 p. 100) in liquido di RINGER (altre indicazioni nel testo).

liari dei lisati di muscolo sul cuore, specie se l'organo è reso insufficiente con artifici vari. L'attività cardiocinetica è stata messa in evidenza in diverse condizioni sperimentali, e l'effetto inotropo positivo rappresenta uno dei fenomeni più significativi e, quantitativamente, non raggiungibile con nessun altro farmaco, nemmeno con glucosidi ad azione digitalica (Fig. 1).

D'altra parte, ricerche di KÜNG¹ hanno dimostrato che un particolare estratto di cuore ha la proprietà di restaurare la capacità contrattile del cuore di Rana inattivo da diverse ore; risultati analoghi sono stati ottenuti da uno di noi con lisati di muscolo sul cuore in fibrillazione da affaticamento (SCARINCI⁴). È da ricordare, infine, che le prime osservazioni che si riferiscono all'attività cardiocinetica degli estratti di cuore, sono dovute a HÄUSLER².

Abbiamo, pertanto, voluto indagare l'azione dei lisati di muscolo³ sul cuore di Rana arrestato mediante la

prima legatura di STANNIUS; su tali ricerche riferiremo brevemente.

Risultati sperimentali e discussione. Le esperienze sono state sempre eseguite sul cuore isolato di Rana (*Rana esculenta*), sia immerso in un bagno ossigenato atto a conservarne la sopravvivenza, sia montato su una canula secondo la tecnica di STRAUB. In ogni caso, la legatura veniva eseguita dopo circa un'ora dall'allestimento del preparato, con lo scopo di provvedere a un accurato lavaggio dell'organo.

I risultati sono stati positivi in ogni caso. Infatti, dopo la legatura, non appena il liquido di RINGER viene sostituito con la soluzione contenente i lisati (soluzione di concentrazione 2 p. 100), si ha la ripresa immediata dell'attività contrattile che appare subito ritmica, con pulsazioni più ampie di quelle basali (Fig. 2).

La funzionalità cardiaca si mantiene normale per lungo tempo; noi abbiamo mantenuto in efficienza cuori bloccati e immersi in un bagno ossigenato contenente lisati di muscolo, rinnovando il liquido ogni dodici ore, per tre giorni in ogni caso, e, alcune volte, fino a cinque giorni. A tale proposito, ricordiamo che il KÜNG¹, con osservazioni comparative dei tempi di sopravvivenza di cuori isolati di Rana, trattati con estratti di cuore e non trattati, ha dimostrato che i cuori trattati presentano un tempo di sopravvivenza notevolmente più lungo ed anche una capacità di lavoro più elevata, nei confronti dei cuori non trattati.

Nel nostro caso, se dopo aver ripristinato l'attività cardiaca con la soluzione contenente lisati, si lava con liquido di RINGER, si verifica di nuovo l'arresto del cuore, che può venire ulteriormente riattivato con la soluzione contenente lisati. Il fenomeno può essere ottenuto diverse volte sullo stesso preparato.

A nostro avviso, i punti più significativi dei risultati ottenuti nelle presenti ricerche sono due: 1. la ripresa immediata dell'attività cardiaca; 2. la ritmicità che perdura per lungo tempo.

Il primo fenomeno sottintende un principio avviatore; il secondo dimostra l'esistenza di fattori che consentono un'attività ritmica duratura.

Noi non conosciamo esattamente né la natura dell'arresto provocato dalla legatura, né le cause che determinano il ripristino spontaneo dell'attività automatica;

¹ H. L. KÜNG, Schweiz. med. Wschr. 80, 205 (1950).

² H. HÄUSLER, Arch. exp. Path. Pharmacol. 190, 212 (1938).

³ Esprimiamo i nostri ringraziamenti alla Ditta Braglia di Milano per averci gentilmente forniti i lisati da noi impiegati.

⁴ H. L. KÜNG, Schweiz. med. Wschr. 80, 205 (1950).

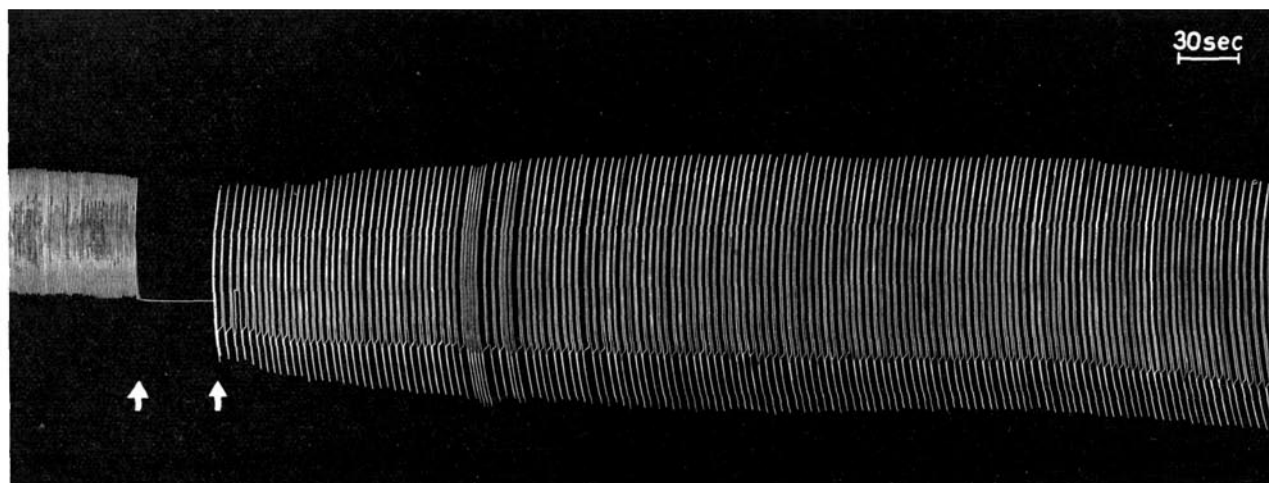


Fig. 2. Cuore isolato di Rana perfuso secondo STRAUB; alla prima freccia, viene operata la prima legatura di STANNIUS; alla seconda, s'inizia la perfusione con una soluzione di lisati di muscolo in RINGER (spiegazione e altre indicazioni nel testo).



Fig. 3. Cuore isolato di Rana perfuso secondo STRAUB; alla prima freccia, viene operata la prima legatura di STANNIUS; alla seconda, s'inizia la perfusione con liquido di RINGER contenente una quantità di NaCl pari a 1/3 della normale, e reso isotonico con glucosio (vedasi la spiegazione nel testo).

ci sono note, tuttavia, alcune condizioni che abbreviano il tempo dell'arresto, come, per esempio, la composizione del liquido di perfusione. HOFFMANN¹ ha visto che se il cuore bloccato viene perfuso con una soluzione contenente poco cloruro di sodio e molto glucosio, s'ottiene il ripristino dell'attività cardiaca. In realtà, perfondendo l'organo arrestato con soluzioni ricche in glucosio, la contrattilità delle parti sottostanti la legatura viene riavviata; ma noi non siamo mai riusciti ad ottenere un'attività ritmica: in generale, si nota un ritmo periodico durante il quale le pulsazioni cardiache si succedono a gruppi, separati tra loro da pause più o meno lunghe (Fig. 3).

La durata del blocco dipende anche dalle condizioni di nutrizione del cuore (SKRAMLIK²).

I lisati di muscolo contengono diversi aminoacidi e sono particolarmente ricchi in istidina e arginina (0,260 g p. 100). Si poteva pensare che la riattivazione del cuore bloccato fosse in relazione con la presenza di tali corpi chimici; questo modo di vedere era avvalorato dai risultati di recentissime ricerche di MISLIN e RIESTERER³ i quali hanno dimostrato, tra l'altro, che l'arginina, in soluzioni di concentrazioni variabili da 0,025 a 0,1 p. 1000, esercita un'attività regolatrice sulla funzione cardiaca. Noi abbiamo eseguito due ricerche collaterali: la prima, perfondendo il cuore arrestato con un liquido di RINGER cui erano stati aggiunti gli aminoacidi arginina e istidina in proporzioni tali da ottenere le medesime concentrazioni presenti in una soluzione di lisati al 2 p. 100; la seconda, perfondendo l'organo con le soluzioni di arginina adoperate da MISLIN e RIESTERER. I risultati sono stati negativi in ogni caso: infatti, non solo le soluzioni contenenti gli aminoacidi non hanno il potere di restaurare l'attività contrattile del cuore bloccato, ma, se dopo aver ottenuto la rianimazione dell'organo per mezzo di lisati, si perfonde con una qualsiasi delle soluzioni di

aminoacidi suddette, il cuore si arresta nuovamente, per riprendere a funzionare quando viene ancora perfuso con lisati. In altri termini, nelle nostre condizioni sperimentali, le soluzioni contenenti aminoacidi si comportano come il liquido di RINGER normale.

È molto verosimile, tuttavia, che i lisati di muscolo contengano sostanze atte a migliorare il trofismo del miocardio; tale influenza eutrofica, però, sembra possa essere invocata solo in via subordinata, in quanto, se è vero che le condizioni di nutrizione possono accorciare il tempo di arresto, appare per lo meno poco probabile che tale influenza possa avere un effetto immediato. È presumibile che l'attività cardiocinetica dei lisati di muscolo entri in giuoco nel determinismo del fenomeno di riattivazione immediata della contrattilità.

Lo stimolo, infatti, di qualsiasi natura sia, meccanico, elettrico (corrente continua) o chimico, è capace di ridestare immediatamente l'attività contrattile del cuore bloccato dalla prima legatura di STANNIUS.

A proposito dello stimolo chimico, noi abbiamo visto, con altre ricerche collaterali, che soluzioni di ouabaina di concentrazione 1:20000 possono riavviare immediatamente la contrattilità del cuore di Rana bloccato alla STANNIUS; però, in queste condizioni sperimentali, l'attività cardiaca si presenta disordinata e irregolare, osservandosi contrazioni molto rare e non ritmiche. Altrettanto dicasi per la stimolazione elettrica, in cui di preferenza si verificano serie di pulsazioni separate da intervalli più o meno lunghi. Tutto ciò dimostra che anche quando lo stimolo è costante e continuo, il cuore viene riavviato ma non s'ottiene mai un'attività regolare.

La conclusione che sembra possa trarsi dai risultati delle presenti ricerche è che i lisati di muscolo esplicino la loro azione con duplice meccanismo: cardiocinetico e eutrofico. Il primo sarebbe responsabile dell'immediata ripresa dell'attività del cuore, mentre il secondo entrebbe in causa come regolatore di tale attività e condizionerebbe il perdurare di essa.

V. SCARINCI e E. ZARA

Istituto di Farmacologia e Farmacognosia, Università di Urbino, il 15 febbraio 1954.

¹ Citato da C. J. ROTHBERGER, in A. BETHE e G. BERGMANN, *Handbuch der normalen und Pathologischen Physiologie* (Julius Springer, Berlin 1926).

² E. SKRAMLIK, *Pflüger's Arch.* 184, 21 (1920).

³ H. MISLIN e L. RIESTERER, *Helv. physiol. Acta* 11, C 67 (1953).

Zusammenfassung

Die Wirkung von Muskelextrakten auf das isolierte, durch die erste Stannius-Ligatur blockierte Froschherz wurde untersucht. Der Extrakt bewirkt die sofortige Wiederherstellung der Herzfähigkeit, die sodann regelmässig längere Zeit anhält.

Die Wirkung der Muskelextrakte kann durch einen doppelten Mechanismus, cardiokinetisch und eutrophisch, erklärt werden.

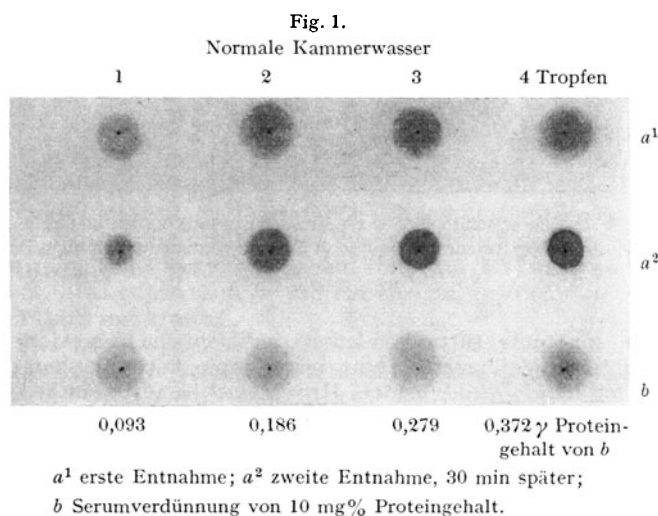
Neue mehrfache Untersuchungen am gleichen Kammerwasser menschlicher Augen

Eine einzelne Punktion von Kammerwasser beim Menschen erbringt höchstens ein Volumen von $0,25 \text{ cm}^3$, meist jedoch ist nur mit $0,12$ bis $0,18 \text{ cm}^3$ zu rechnen. Beabsichtigt man jedoch, mehrere Untersuchungen am gleichen Kammerwasser durchzuführen, so müssen Mikromethoden herangezogen werden. Dazu haben wir folgenden Arbeitsgang ausgearbeitet: die sterile Ampulle, in welcher das Kammerwasser enthalten ist, wird geöffnet und ihr Gewicht plus Kammerwasser bestimmt. Anschliessend erfolgt die *Bestimmung des spezifischen Gewichtes* des Kammerwassers. Dazu werden erst Mischungen von Xylol und Brombenzol hergestellt, deren spezifische Gewichte so abgestuft sind, dass das zu erwartende spezifische Gewicht des Kammerwassers einem mittleren Wert gleichkommt. Für die unten im Abstufungszyylinder befindliche Mischung verwenden wir $65,84 \text{ cm}^3$ Chlorbenzol und $34,16 \text{ cm}^3$ m-Xylol mit dem spezifischen Gewicht von $1,0181$, darüber wird nach den Angaben von Vogt¹ die leichte Mischung vorsichtig aufgeschichtet. Sie enthält $60,85 \text{ cm}^3$ Chlorbenzol und $39,15 \text{ cm}^3$ m-Xylol mit dem spezifischen Gewicht von $0,9953$. Als Standardlösungen richten wir uns drei Kochsalzlösungen von $0,43\%$, $0,86\%$ und $1,29\%$, die das spezifische Gewicht $1,0021$, $1,0045$ und $1,0070$ besitzen. Als Kapillarpipette verwenden wir die Aglapipette mit Mikrometervorschub, mit der Volumen von $0,001 \text{ cm}^3$ mit einer Genauigkeit von $\pm 0,00005 \text{ cm}^3$ gemessen werden können. Das mittlere Tropfengewicht betrug bei unseren Untersuchungen $9,3 \text{ mg}$ (doppelt destilliertes Wasser).

Für jede Messreihe wird zuerst mit den Standardlösungen der Dichtegradient der Abstufmischung geprüft. Die Ablesung am Präzisionszylinder von 250 cm^3 Inhalt erstreckt sich im Mittel über 52 mm . Da eine Dichteschwankung von $0,5 \text{ mm}$ gut abgelesen werden kann, sind Änderungen des spezifischen Gewichtes von $0,000047$ noch messbar. Die stets durchgeführten Doppelbestimmungen benötigen 2 Tropfen aus der Aglapipette und lassen noch 16–20 Tropfen übrig, die zum Zählen der Zellen, zur Anlage einer bakteriologischen Kultur und zur *Bestimmung des Proteingehaltes* benutzt werden können. Dazu werden aus der gleichen Pipettenfüllung ein, zwei und drei Tropfen Kammerwasser auf einen Streifen Munktellpapier Nr. 150 (Grycksbo, Schweden) im Abstand von 3 cm aufgebracht.

Mit gleicher Technik werden auf demselben Papierstreifen Tropfen einer normalen, humanen Serumverdünnung von $10 \text{ mg}\%$ aufgebracht. Nachdem sie lufttrocken sind, werden die proteinhaltigen Stellen erst mit Amidoschwarz gefärbt (vgl. WUNDERLY)², darauf

mit einem Stechbeutel von 15 mm innerem Durchmesser ausgestochen, fein zerschnitten und im Reagenzglas zur Elution mit 3 cm^3 50% Methanol, dem $5 \text{ g}\%$ Soda zugemischt ist, übergossen. Nach 8 h wird abgegossen, erneut mit 3 cm^3 überschichtet und nach weiteren 8 h die Elutionsflüssigkeiten vereinigt und filtriert. Die kolorimetrische Auswertung erfolgt im Beckman D.U. auf Wellenlänge $595 \text{ m}\mu$, wobei ein gleichgewonnener Leerwert des Papiers als Vergleichsflüssigkeit dient. Der Proteingehalt des Kammerwassers ergibt sich aus dem Vergleich mit den Extinktionen (Bezugswerten) der Serumverdünnung von $10 \text{ mg}\%$ Proteingehalt. Stets sind nur die Färbungen eines Papiers untereinander vergleichbar. Die Reproduktionsgenauigkeit liegt hier bei $\pm 3,7\%$.



Die Ampullen, aus denen das Kammerwasser in die Aglapipette gesogen wurde, werden erst mit NaCl phys. und dann mit H_2O dest. gewaschen und gewogen (Leergewicht). Die Differenz mit der ersten Wägung bringt das Gewicht der Kammerwasserabnahme (siehe Kolonne 1 in Tabelle I). Wenn die gefundene Menge Protein in $\text{mg}\%$ dazu in ein Verhältnis gesetzt wird, so erhält man die Angabe der Proteinkonzentration in γ . Schliesslich werden die *anorganischen Bestandteile* des Kammerwassers als Kochsalzionen in Rechnung gestellt, da das spezifische Gewicht an standardisierten Kochsalzlösungen vergleichend gemessen wurde.

Die untenstehende Tabelle gibt nun die Werte von 23 normalen Kammerwassern menschlicher Augen wieder, die überwiegend von amblyopen Augen mit einer Sehschärfe von unter $\frac{3}{60}$ und unter stets gleichbleibenden Bedingungen entnommen werden. Eine kritische klinische Würdigung bedarf eines weiter gespannten Rahmens und wird ebenso wie eine Zusammenstellung der Eiweissverhältnisse bei wiederholten Punktionen in Kürze folgen.

Um eine für die *Papierelektrophorese* hinreichend grosse Menge an Protein zu erhalten, ist es notwendig, zwei oder besser drei Kammerwasserpunktate in einer Ampulle zu vereinigen. Aus einer gläsernen Düse wird Pressluft eingeblasen, welche die Flüssigkeit rasch abdunstet. Wenn das Volumen etwa auf $0,02 \text{ cm}^3$ zurückgegangen ist, wird alle Flüssigkeit in eine Kapillarpipette aufgesogen und alsbald punktförmig auf einen Munktell-Papierstreifen aufgetragen. Nach Papierelektrophorese werden die Spherogramme mit normalem Serumprotein verglichen, das gleich weit gewandert ist. Der Vergleich

¹ H. VOGT, Dissertation Zürich 1950.

² CH. WUNDERLY, Chimia 7, 145 (1953).