

Bindegewebswachstums bei der Auffindung klinischer Wirkungen zu berücksichtigen.

P. DESAULLES, W. SCHULER
und R. MEIER

Wissenschaftliche Laboratorien der Ciba-Aktiengesellschaft Basel, den 30. Oktober 1954.

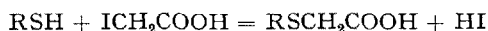
Summary

Aldosterone applied locally in doses of 50–100 γ enhances slightly the growth of granuloma and in doses of up to 200 γ fails to inhibit such growth. In the doses, then, its action differs from that of hydrocortisone, cortisone, and cortexone.

The Toxic Action of Halogenated Alkylating Substances on Insects.

Inhibition of Triosephosphate Dehydrogenase

In a previous paper¹ we have described the insecticidal action by contact of some alkylating substances (chloro-, bromo-, iodoacetic acids and their esters) on insects. With iodoacetic acid, nearly all iodine penetrated by contact into the insect was recovered as inorganic iodide. This seems to indicate a reaction of the following type:



since, as demonstrated by MICHAELIS and SCHUBERT², under physiological conditions, iodoacetic acid reacts with thiol groups, whereas it does not react with amino or hydroxyl groups.

As the toxic action of iodoacetic acid on vertebrates is due to the inhibition of thiol enzymes³, we have studied the effect of iodoacetic acid on the succinic dehydrogenase of insects *in vivo* and *in vitro*. As already published⁴, we found no evident inhibition of succinic dehydrogenase on the muscle tissue of *Periplaneta americana*, neither *in vitro* at a concentration of about 0.007 M, nor *in vivo* at doses highly above lethal.

In the course of recent studies, however, we have observed that triosephosphate dehydrogenase (TPD) is considerably inhibited by halogenated alkylating substances in *P. americana* and *Musca domestica*, *in vitro* as well as *in vivo*. We have developed a colorimetric method for dosage of TPD employing 2,6-dichlorophenolindophenol as hydrogen acceptor. In our *in vitro* experiments, iodoacetic acid at concentrations of 0.0005 M inhibits 80% of TPD.

For the experiments *in vivo* we have employed the following technique. One metathoracic leg has been cut off from females of *P. americana* (groups of 100 individuals each) at the level of the trochantin eliminating the femur and the other distal segments. The same individuals have then been injected with an aqueous solution of sodium iodoacetate, and after 60' the metathoracic leg of the opposite side was cut off in order to evaluate the eventual inhibition of TPD by the injected substance. At doses of 1 mg/g (the LD₅₀ for females *P. americana* being equal to 0.1 mg/g), a complete inhibition of the enzyme was reached.

TPD has also been determined on *M. domestica* extracts. Groups of 100 females belonging to the following strains have been used: Roman susceptible strain; Sardinian strain resistant to DDT and Chlordane. Both strains were found to be equally susceptible to chloroacetic acid.

The TPD activity of fly extracts of unpoisoned individuals proved to be equal for the two strains. In our toxicity tests, groups of houseflies have been placed in contact with filter paper treated with an olive oil solution of chloroacetic acid at concentrations varying from 0.25 to 6.0 g/sq.m.

The "kill"¹ percentage and the enzyme inhibition percentage have been determined for all groups. It was shown that inhibition and "kill", relative to the chloroacetic acid concentrations, have a parallel trend; the values of inhibition are lower than those of "kill" (Table). This could be explained either by supposing that, under the conditions described, a 100% inhibition is not essential to determine the death of individuals, or by assuming that these substances inhibit selectively the activity of certain vital organs.

Musca domestica ♀♀ (strain resistant to DDT and Chlordane, age 5 days) exposed to different concentrations of chloroacetic acid. "Kill" percentages and TPD inhibition percentages in fly extracts.

Chloroacetic acid g/m ²	"kill" %	TPD inhibition %
0.5	5	0
1.00	25	6
1.50	65	50
2.00	75	65
3.00	90	75

This second hypothesis is supported by our observations on the cardiac activity of *P. americana*. We have noted that the cardiac activity of roaches which have been injected with different doses of sodium iodoacetate ceased at least one hour before the insects showed any blocking of their voluntary muscles' activity. This blocking of the cardiac activity appears to be an irreversible phenomenon and death occurs after a few hours, according to the dose of the injected substance.

In order to determine whether resistance toward the halogenated alkylating substances could be induced in strains of *M. domestica*, groups of houseflies were taken from the two above-mentioned strains and the adults were exposed for 20 generations to chloroacetic acid by contact. Comparing these two selected strains with the original ones, a small increase in the LD₅₀ for chloroacetic acid (about twice), but no increase of TPD in the *in toto* extracts was observed.

Fuller details of this work will be published in the Rendiconti dell'Istituto Superiore di Sanità, Rome.

S. BETTINI and M. BOCCACCI

Departments of Parasitology and Biology, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy, September 18, 1954.

Zusammenfassung

Nachdem die Verfasser auf ihre früheren Aufsätze über die auf Insekten wirkenden alkylierten halogenierten Stoffe hingewiesen haben, fassen sie die Er-

¹ S. BETTINI and M. BOCCACCI, Riv. Parass. 13, 165 (1952).

² L. Michaelis and M. P. SCHUBERT, J. Biol. Chem. 106, 331 (1934).

³ E. S. GUZMAN BARRON, Advances in Enzymology 11, 201 (1951).

⁴ S. BETTINI and M. BOCCACCI, Rend. Ist. Sup. San. 17, 188 (1954).

¹ We have considered "killed" all individuals knocked down, moribund or dead. Since the toxic action is an irreversible one, all knocked down individuals are destined to die.

gebnisse zusammen, die sie bei der Wirkung der genannten Stoffe auf die in den Muskelgeweben von *P. americana* und *M. domestica* befindlichen Triosephosphatdehydrogenasen (TPD) erzielt haben.

Die Dosierung der TPD ist kolorimetrisch bestimmt worden, indem 2,6-Dichlorphenol-Indophenol als Wasserstoffakzeptor gebraucht wurde.

Es hat sich gezeigt, dass TPD sowohl *in vitro* wie *in vivo* inhibiert wird. In Hausfliegen hat die Mortalität der Fliegen und die TPD-Inhibition bezüglich der verschiedenen Stärken der Dichloressigsäure einen parallelen Verlauf, und die Inhibitionswerte sind niedriger als die der Mortalität.

Hausfliegenstämme, die während 20 Generationen hindurch im Chloressigsäurekontakt selektioniert wurden, weisen weder eine auffällige Resistenzzunahme gegen diesen Stoff noch eine Steigerung von TPD in den Extrakten dieser Fliegen auf.

Der Hyaluronsäuregehalt und die «Hyaluronidase»-Aktivität der Leukozyten

In früheren Mitteilungen haben wir bei mehreren Gelegenheiten darauf hingewiesen, dass die Hyaluronidase («Wyeth», Philadelphia) die Bakterienphagozytose der überlebenden Leukozyten von Kaninchen und Ratten *in vitro* steigert. Der Effekt erreicht bei einer Konzentration von 1 TRU sogar 60–65 % und tritt auch bei Anwendung von zehnmal höherer Verdünnung in Erscheinung. Inaktivierte (56°C) Hyaluronidaselösung ist unwirksam¹.

Um die Erscheinung weiter zu klären, haben wir den Hyaluronsäuregehalt der Leukozyten untersucht.

Drei bis vier hungernden Ratten von je 200 bis 250 g Körpergewicht haben wir je Tier etwa 15 ml sterile Bouillon in die Bauchhöhle injiziert. Nach 6 h wurden die Tiere durch Dekapitation verblutet. Die eröffnete Bauchhöhle wurde mit 20 mg% Zitrat enthaltender physiologischer Kochsalzlösung ausgespült und die ausgewanderten Leukozyten durch Zentrifugierung der Spülflüssigkeit sedimentiert. Das Verfahren wurde mehrmals wiederholt und die Leukozyten so durchgewaschen. Auf diese Weise konnten wir 500 bis 700 mg Leukozyten (Nassgewicht) gewinnen.

Die Bestimmung des Hyaluronsäuregehaltes geschah in autolytierten Leukozyten. Zwecks Verdauung liessen wir die Zellsuspension mit trikresolgesättigtem destilliertem Wasser vermischt 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Die Konzentration der Hyaluronsäure haben wir mittels Turbidimetrie² festgestellt und nach der Hyaluronidasewirkung («Wyeth») die Menge der frei gewordenen reduzierenden Stoffe bestimmt³. Für eine Bestimmung verwendeten wir 200–400 mg Leukozyten.

Unsere Versuchsergebnisse sind in der Tabelle I dargestellt. Sie zeigen, dass in den Leukozyten sowohl turbidimetrisch als auch oxydimetrisch eine ansehnliche Menge Hyaluronsäure nachweisbar ist. Die auf das Nassgewicht berechnete Konzentration beträgt im Mittelwert turbidimetrisch 0,8 %, oxydimetrisch – damit gut übereinstimmend – 0,7 %.

Bei der Untersuchung der «Hyaluronidase»-Aktivität der Leukozyten konnten wir mittels der viskositätsredu-

Tabelle I

Zahl der Versuche	Hyaluronsäuregehalt in % des Nassgewichtes	
	Turbidimetrisch	Oxydimetrisch
1	1,33	—
2	0,37	—
3	0,80	—
4	0,45	0,40
5	0,80	0,74
6	1,01	0,89

zierenden Methode¹ eine ausdrückliche hyaluronsäurezersetzende Wirkung beobachten. Das Versuchssystem bei den viskosimetrischen Bestimmungen war folgenderweise zusammengestellt: Hyaluronsäure, 1%ige wässrige Lösung, 9 ml; Leukozytensuspension (enthaltend 150 mg Leukozyten) 2 ml; Azetatpuffer M/10 2 ml, Ausflussdauer des Viskosimeters mit Wasser bei 18°C 42 s (Tab. II). Da der Effekt weder ein gut definierbares pH-Optimum noch ein Temperaturoptimum besitzt, kann die Erscheinung nicht als Enzymwirkung betrachtet werden. Demnach ist die «Hyaluronidase»-Aktivität der Leukozyten ihrem relativ hohen (20 bis 30 mg %) Ascorbinsäuregehalt² zuzuschreiben. Bekanntlich kann nämlich die Ascorbinsäure in Gegenwart von Spuren von Cu⁺⁺ zwischen oxybiotischen Verhältnissen die Hyaluronsäure oxydativ abbauen³; dieser Prozess ist auch in dem Falle der Leukozyten nachweisbar. Der Effekt lässt sich durch Oxin (8-Oxikinolin) und Semicarbazid hemmen.

Tabelle II

Zahl der Versuche	Rel. Viskositätsabnahme in % während 1 h
1	15
2	18
3	14
4	9
5	13
6	17

Demnach steigert die Hyaluronidase die Phagozytose der Leukozyten auf dem Wege ihrer auf die Leukozyten ausgeübten Wirkung. Durch Enzymwirkung kann die Hyaluronsäure der Leukozyten abgebaut werden. Die Viskosität des Protoplasmas der Zellen nimmt dadurch ab, infolgedessen die amöboide Bewegung und die Durchgänglichkeit der Zellen und damit die Phagozytose erleichtert wird.

An dieser Stelle danken wir Herrn Prof. R. MEIER (Ciba, Basel) und Herrn Dir. Dr. J. SEIFTER (Wyeth, Philadelphia) für die uns freundlichst zur Verfügung gestellte Hyaluronsäure bzw. Hyaluronidase.

G. LUDÁNY und L. PERÉNYI

Pathophysiologisches Institut der Medizinischen Fakultät der Universität Budapest, den 9. August 1954.

¹ G. LUDÁNY, T. ORBÁN und J. VAJDA, Tag. Ung. Physiol. Ges. 7. Sept. 1951; Acta Physiol. Hung. Arch. int. Pharmacodyn. 87, 496 (1952).

² K. MEYER, Physiol. Rev. 27, 335 (1947). – K. MEYER und M. M. RAPPORT, Arch. Biochem. 27, 287 (1950).

³ J. T. PARK und M. I. JOHNSON, J. Biol. Chem. 181, 149 (1949).

¹ J. MADINAVEITIA und T. H. H. QUIBELL, Biochem. J. 34, 625 (1940).

² G. LUDÁNY und K. MÉGAY, C. r. Soc. Biol. Paris 126, 321 (1937).

³ M. G. ROMANINI, Arch. int. Pharmacodyn. 78, 427 (1949). – W. VAN ROBERTSON, M. W. RUPES und W. BAUER, Biochem. J. 35, 903 (1941). – W. DAUBENMERKL, Acta pharmacol. et toxicol. 7, 153 (1951).