

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 unwirksam<sup>1</sup>.

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

Drei bis vier hungrigen 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 Turbidimetrie<sup>2</sup> festgestellt und nach der Hyaluronidasewirkung («Wyeth») die Menge der freigesetzten reduzierenden Stoffe bestimmt<sup>3</sup>. 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 Methode<sup>1</sup> 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%) Ascorbinsäuregehalt<sup>2</sup> zuzuschreiben. Bekanntlich kann nämlich die Ascorbinsäure in Gegenwart von Spuren von Cu<sup>++</sup> zwischen oxybiotischen Verhältnissen die Hyaluronsäure oxydativ abbauen<sup>3</sup>; 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.

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

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

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

<sup>1</sup> J. MADINAVEITIA und T. H. H. QUIBELL, Biochem. J. 34, 625 (1940).

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

<sup>3</sup> 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).

## Summary

The hyaluronic acid content of leucocytes from the peritoneum of rats shows a significant concentration when measured either turbidimetrically or oxydimetrically, the average value calculated for wet weight being 0.7–0.8%. The hyaluronic acid break down capacity of the leucocytes is not a specific enzyme action but can be attributed to their high ascorbic acid content. The phenomenon has no well defined pH or temperature optimum and can be inhibited by oxine and by semicarbazide.

## Die Wirkung von Kalium und Calcium auf das Treppenphänomen am Froschherzen<sup>1</sup>

In früheren Untersuchungen<sup>2</sup> war gezeigt worden, dass die zeitliche Entwicklung der Herzglykosidwirkung am elektrisch gereizten Froschventrikelpreparat von der Zahl der während der Einwirkungszeit des Glykosids erfolgten Herzkontraktionen abhängt, was auf eine Beeinflussung der Ionentransporte im Erregungs- und Erholungszyklus zurückgeführt wurde. Diese Deutung wurde weiter gestützt durch den Nachweis, dass die Herzglykosidwirkung in ausgesprochener Weise vom Konzentrationsverhältnis der Ionen in der verwendeten Ringerlösung abhängt<sup>3</sup>. Erhöhung der Calciumkonzentration oder Verminderung der Kaliumkonzentration wirken verstärkend und umgekehrt. Im Hinblick auf die bekannte, von LOEWI<sup>4</sup> beschriebene Sensibilisierung des Herzmuskels gegenüber Calciumionen und auf den Befund von SCHATZMANN<sup>5</sup>, dass Herzglykosid den aktiven Kalium-Natrium-Austausch am Erythrozyten hemmt, wurde angenommen, dass die Herzglykosidwirkung in einer Hemmung von Ionentransporten durch die Muskelzellmembran besteht, auf Grund derer sich die Calciumionenkonzentration im Inneren der Zelle erhöht.

SZENT GYÖRGY<sup>6</sup>, der ebenfalls die Ionentransporte durch die Membran als den Angriffspunkt des Herzglykosids betrachtet, hat als Kriterium das Phänomen der Bowditchschen Treppe eingeführt. Er zeigte, dass die Treppe sowohl durch Digitalis als auch durch kaliumfreie Ringerlösungen unterdrückt werden kann. Er nahm danach an, dass sie auf Anhäufung von Kalium im Inneren der Muskelfaser während der Ruheperiode beruht und dass Digitalis den Kaliumeintritt hemmt.

Die von uns bevorzugte Annahme, dass für die muskuläre Glykosidwirkung Wesentliche sei die Innenkonzentration der Calciumionen, stützte sich einmal auf die genannte Beziehung zur Calciumsensibilisierung durch Herzglykoside, dann aber auch auf die Tatsache, dass am Aktomyosinsystem Kalium und Natrium sich ähnlich verhalten<sup>6</sup>, so dass eine Beeinflussung des Aktomyosins von dieser Seite aus weniger wahrscheinlich erschien, da sowohl beim Erregungsvorgang als beim Erholungsvorgang die Gesamtbilanz in erster Annäherung ein Austausch von Kalium gegen Natrium zu sein scheint.

<sup>1</sup> Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Roche-Stiftung durchgeführt.

<sup>2</sup> B. LÉVI, *Die Abhängigkeit der Strophanthosidwirkung auf das Froschherz von der Tätigkeit des Herzens*. Dissertation, Bern 1953. – W. WILBRANDT, K. BRAWAND und P. N. WITT, Arch. exp. Path. Pharm. 219, 397 (1953).

<sup>3</sup> W. WILBRANDT und R. CAVIEZEL, Arch. exp. Path. Pharm. 222, 203 (1954).

<sup>4</sup> O. LOEWI, Arch. exp. Path. Pharm. 82, 131 (1918).

<sup>5</sup> H.-J. SCHATZMANN, Helv. physiol. Acta 11, 346 (1953).

<sup>6</sup> A. SZENT-GYÖRGYI, *Chemical physiology of Contraction in Body and Heart Muscle* (Academic Press, New York 1953).

Dagegen übt Calcium eine sehr ausgesprochene Wirkung auf Aktomyosin schon in niedrigen Konzentrationen aus<sup>1</sup>, die als kontraktions- und kontrakturbegünstigend bezeichnet werden kann.

Die Annahme einer Beteiligung der Calciumionen wurde weiter gestützt durch den Nachweis, dass der Austritt von <sup>45</sup>Ca aus dem Ventrikelpreparat durch Herzglykosid gehemmt werden kann<sup>2</sup>.

In bezug auf die Bowditchsche Treppe wäre dann mit einiger Wahrscheinlichkeit zu erwarten, dass sie durch Erhöhung der Calciumionenkonzentration ähnlich unterdrückt oder vermindert werden sollte wie durch Kaliummangel. Die hier mitgeteilten Versuche dienen der Prüfung dieser Folgerung.

**Methodik.** Die Versuche wurden am elektrisch gereizten, isotonisch arbeitenden Froschventrikelpreparat durchgeführt, das in einem offenen Kreislauf arbeitet (Doppelkanüle und Ventile). Das Schlagvolumen wurde mit später ausführlicher zu beschreibenden pneumatischen Übertragungsmethoden am freischlagenden Herzen (ohne Serrefine) registriert. Die Reizung erfolgte mit rechteckigen Stromstößen (Grass-Stimulator, 45 V, 5 ms) alle 3 s. Zur Entwicklung der «Treppe» wurden reizfreie Pausen von 10 min eingeschaltet.

**Resultate.** Abbildung 1 zeigt einen Versuch, in dem die Treppe durch Verdoppelung der Calciumionenkonzentration der Ringerlösung fast aufgehoben wird, in Übereinstimmung mit der Erwartung.

Zum quantitativen Vergleich zwischen der Wirkung von Kaliummangel und Calciumüberschuss wurden alternierende Reizperioden (mit 10 min Reizpause) in normaler Ringerlösung, Ringerlösung mit vermindertem Kaliumgehalt und Ringerlösung mit erhöhtem Calciumgehalt durchgeführt, wobei die beiden Ionenkonzentrationen in gleichen Verhältnissen (mit  $p$  bezeichnet) abgestuft wurden (zum Beispiel  $p = 1,4$ : Kalium 1/1,4-fach, Calcium 1,4-fach).

Als Mass der «Treppe» wurden aus  $V_1$ , dem Schlagvolumen der ersten Kontraktion nach der Reizpause (bzw.  $V_{1-7}$ , dem mittleren Schlagvolumen der ersten sieben Kontraktionen), und  $V_m$ , dem maximalen Schlagvolumen der gleichen Reizperiode, Treppenquotienten  $T$  gebildet:

$$T_1 = \frac{V_m - V_1}{V_m} \quad \text{und} \quad T_{1-7} = \frac{V_m - V_{1-7}}{V_m}.$$

In Abbildung 2 ist ein solcher Versuch wiedergegeben. Er zeigt, dass bei gleichem  $p$  Calciumüberschuss stärker wirkt als Kaliummangel. – Er zeigt ausserdem, dass der Treppenquotient in Ringerlösung  $T_R$  zeitlich nicht konstant ist, so dass es zweckmässig scheint, die Quotienten  $T$  auf den jeweiligen (durch Interpolation zu ermittelnden) Quotienten zu beziehen und relative Quotienten  $T' = T/T_R$  zu benützen.

Abbildung 3 zeigt im Mittel aus zwei ähnlichen Versuchsreihen  $T'$  als Funktion von  $p$  für Calciumüberschuss und Kaliummangel, getrennt für  $T'_1$  und  $T'_{1-7}$ .

Vergleicht man Kalium- und Calciumkonzentrationen gleicher Wirksamkeit (das heisst mit gleichen Werten von  $T'$ ) durch die Relation  $\log p_K = n \cdot \log p_{Ca}$  oder  $p_K = p_{Ca}^n$ , so ergibt sich aus diesen Versuchen für  $T'_1$  ein Wert von  $n = 4,8$ , für  $T'_{1-7}$  ein solcher von  $n = 3,25$ .

Das Verhältnis der Wirkung von Calciumüberschuss und Kaliummangel hängt danach davon ab, ob  $T'_1$  oder  $T'_{1-7}$  als Mass benützt wird. Da  $T'_1$  nur oder vorwiegend

<sup>1</sup> E. BOZLER, Amer. J. Physiol. 167, 276 (1951).

<sup>2</sup> W. WILBRANDT und R. CAVIEZEL, Helv. physiol. Acta 1954 (im Druck).