

Agarstückchen bestimmter Grösse ($0,2 \text{ mm}^3$) in die rechte Hinterextremität von *Ambystoma mexicanum* implantiert (HARTWIG⁶). Das äussere Erscheinungsbild dieser Tiere wie auch der allgemeine Befund des Skeletts weisen darauf hin, dass das örtlich gesetzte Thyroxindepot sich nicht auf den Organismus in seiner Gesamt-

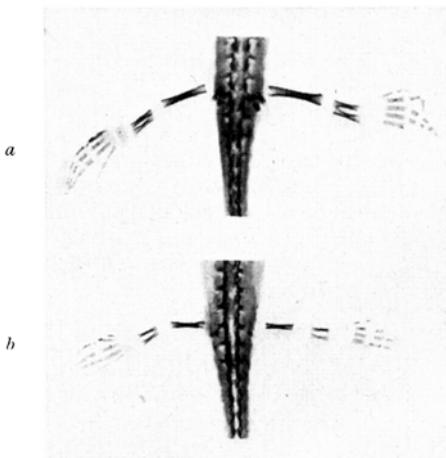


Abb. 3. Kalzifikationen der hinteren Extremitäten und der Sakralregion bei *Ambystoma mexicanum* (Aufhellungspräparat, Alizarinfärbung), Vergrösserung $1,25 \times$. a Förderung der Kalkeinlagerung durch Implantation von Thyroxin-Agar an den rechten Femur. b Unspezifische Entwicklungshemmung nach Implantation von reinem Agar an den rechten Femur.

heit ausgewirkt hat. In der das Thyroxinimplantat tragenden Extremität hingegen ist eine intensivere Kalkeinlagerung festzustellen: die Diaphysen sind länger, die Knochenhülsen stärker verknöchert (Abb. 3a). Auch die auf der Implantatseite gelegenen Teile des Beckengürtels nebst den betreffenden Sakralrippen erfahren eine weiter ausgedehnte Verknöcherung als die entsprechenden Skelettelemente der Gegenseite. Axolotl hingegen, bei denen zur Kontrolle ein Implantat aus reinem Agar ohne Thyroxinzusatz gesetzt wurde, lassen eine entsprechende Förderung der Kalkeinlagerung vermissen; vielmehr tritt als unspezifische Nebenwirkung der Operation in diesen Fällen eher eine örtliche Verzögerung in der Verknöcherung ein (Abb. 3b).

Die Veränderungen im Skelettesystem nach lokaler Thyroxinapplikation zeigen also, dass das Schilddrüsenhormon unmittelbar in den Prozess der Kalkablagerung eingreift.

Es ergibt sich somit, dass bei einer experimentell ausgelösten Entwicklungsbeschleunigung wie zum Beispiel die Epidermis so auch das skelettogene Gewebe auf das Schilddrüsenhormon und zwar durch intensivierten Einbau von Kalzium in die Knochen anspricht. Die Reaktionsbereitschaft der einzelnen Skelettelemente tritt auch hier zu verschiedenen Zeitpunkten auf (KUHN⁷). Es ist anzunehmen, dass im Verlauf der unbbeeinflussten Amphibienmetamorphose die Schilddrüse bei dem Verkalkungsprozess des Skeletts eine entsprechende Rolle spielt.

O. KUHN und H. O. HAMMER

Zoologisches Institut der Universität Köln, den 15. September 1955.

⁶ H. HARTWIG, Biol. Zentralbl. 60, 473 (1940).

⁷ O. KUHN, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen VI 7, 13 (1933).

Summary

Larvae of *Salamandra salamandra quadrivirgata* Dürrigen and tadpoles of *Xenopus laevis* Daud, treated with a percutaneous application of thyroxin, show a more intensive calcification of their skeletal system after a precocious metamorphosis. The calcified area of bones is increased; additional centres of calcification can be distinguished in quite a number of other skeletal elements. By thyroxin-soaked agar implants in the hindlimbs of *Ambystoma mexicanum*, deposition of calcium salts is furthered in the bones of the leg treated, as well as in the adjacent pelvic girdle, thus demonstrating that the thyroid hormone exerts a direct effect upon calcification. It is supposed that during normal metamorphosis the thyroid gland plays an equal part in the process of calcification in the skeletal system.

Parathion Metabolism in Rat Liver and Kidney Slices

Parathion¹, when pure, is known not to inhibit cholinesterase *in vitro*². It is, however, changed in the organism to an active inhibitor of cholinesterase which has been identified as paraoxon³. This change was found to be enzymatic and to take place in the combined fractions of

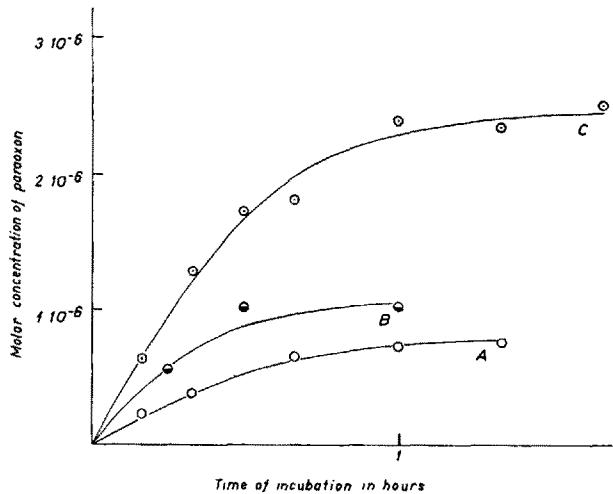


Fig. 1.—Accumulation of paraoxon with liver slices. Total volume 15 ml, concentration of parathion in A $1,18 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (dry weight of the tissue 92 mg), in B 2, $36 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (94 mg), in C $4,72 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (103 mg).

hepatic microsomes and the supernatant in the presence of oxygen⁴. Hepatectomy is known to give no protection to rats against the lethal effect of parathion⁵, and this suggested the possibility that the conversion into an active inhibitor of cholinesterase takes place in other organs than in the liver.

¹ OO-Diethyl-O-p-nitrophenyl-thiophosphate.

² W. M. DIGGLE and J. C. GAGE, Biochem. J. 49, 491 (1951).

³ J. C. GAGE, Biochem. J. 54, 426 (1953).

Diethyl-p-nitrophenylphosphate.

⁴ N. A. DAVIDSON, Biochem. J. 61, 203 (1955).

⁵ W. M. DIGGLE and J. C. GAGE, Nature 168, 998 (1951).

In experiments which are described in this paper, this conversion was studied in various tissues *in vitro* in order to obtain quantitative information of the effectiveness of the systems concerned. The development of anticholinesterase activity during incubation in oxygen atmosphere of tissue slices of female rats in the presence of various amounts of parathion was followed. Human red cell cholinesterase was used⁶, and its activity was measured manometrically. The inhibitory activity was calculated in terms of paraoxon using the experimentally obtained calibration curve. So far only liver and kidney tissue and the intestine have been found to produce a detectable amount of anticholinesterase activity under these conditions.

In liver slices, the inhibitory activity increased in the beginning of the experiment; however, it soon reached its final value and then did not change. This final concentration was not related to the amount of tissue, but was related to the concentration of the parathion present (Fig. 1). On the other hand, in kidney slices the inhibiting activity of the solution increased for a period of 2 h according to a curve which is almost a straight line, the slope of which is proportional to the amount of tissue (Fig. 2).

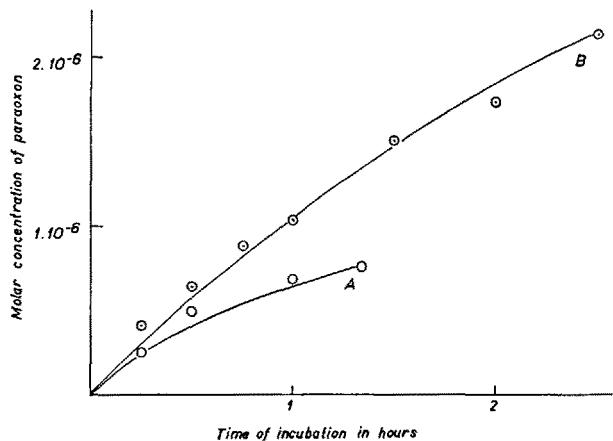


Fig. 2.—Accumulation of paraoxon with kidney slices. Total volume 15 ml, concentration of parathion $4.6 \cdot 10^{-5} M$, dry weight of the tissue in A 95 mg, in B 202 mg.

The explanation of this difference was sought in different rates of splitting of the resulting inhibitor which is supposed to be identical with paraoxon in both tissues studied. The added paraoxon was metabolized rapidly by the rat liver and the reaction rate was proportional in the concentrations used to the amount of tissue and to the concentration of paraoxon; in the kidney, the splitting of paraoxon was considerably slower (Fig. 3).

It can therefore be assumed that during incubation of liver slices with parathion, the concentration of paraoxon in solution soon reaches a value at which the rate of its splitting is equal to the rate of its production. This value is constant during the experiment, since the concentration of parathion does not actually change. In the kidney, where the splitting of paraoxon is much slower, this steady state is not reached during the experiment.

The gut gives somewhat irregular results. Its effectiveness, however, certainly does not approach that of the

liver, which seems to be the organ most important in the metabolism of parathion.

The actual rate of the production of paraoxon can be calculated for the liver from the concentration at the steady state, when the rate of the production of paraoxon is equal to the rate at which it is being split. For the kidney it can be estimated from the slope of the initial part of the curve (Fig. 2).

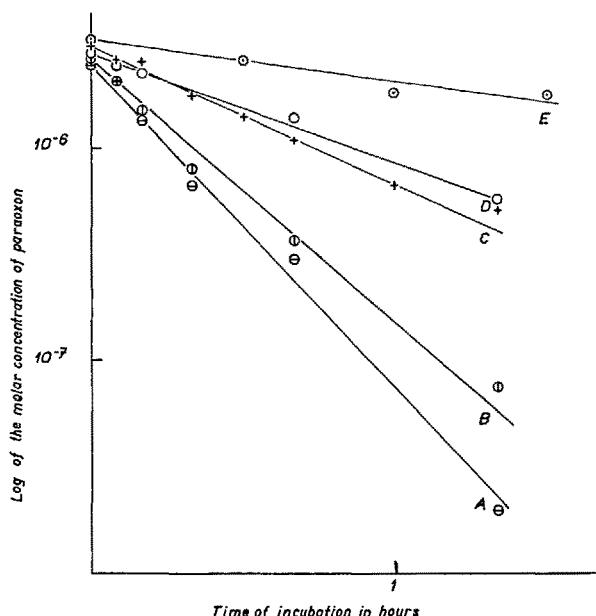


Fig. 3.—Splitting of paraoxon in liver (A, B, C, D) and kidney (E) slices. Total volume 15 ml, dry weight of the tissue in A 95 mg, in B 88 mg, in C 57 mg, in D 45 mg and in E 196 mg (both kidneys were cut quantitatively).

From these values and making certain assumptions, one can deduce approximatively the activity *in vivo* of the systems studied. If we assume that the lethal dose of parathion is diluted to the volume of the body of the animal, the resulting concentration will lie within the limit used on incubation with tissue slices in the experiments described. Under these conditions, the whole liver and kidney together with the intestine would change in one hour not more than 6% of the total parathion to paraoxon, which would be for the greater part further metabolized. This means that the half-time of this reaction is 12 h.

In view of the fact that in most cases death from parathion intoxication occurs within the first hour after injection, this may seem to be contradictory to the ratio of the lethal doses of these two substances, the LD₅₀ for parathion being 4 mg/kg for female rats on intraperitoneal administration, and 1.2 mg/kg for paraoxon⁷. This apparent contradiction might be explained as follows. In paraoxon poisoning the substance is very rapidly split in the organism not only by liver and kidney but also in the blood⁸, and its concentration falls rapidly below the effective level so that the corresponding enzymatic systems of the organism are exposed to higher concentrations of the drug only for a relatively short time. In parathion poisoning, a low but steady

⁷ K. P. DU BOIS, J. DOULL, P. R. SALERNO, and J. M. COON, J. Pharmacol. 95, 79 (1949).

⁸ W. M. ALDRIDGE, Biochem. J. 49, 1 (1951).

concentration of paraoxon is maintained in the blood for a longer period.

J. KUBIŠTOVÁ

Institute of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, Praha, January 31, 1956.

Zusammenfassung

Es werden quantitative Angaben über die Bildung von Paraoxon aus Parathion und seine weitere Aufspaltung durch Inkubation mit Leber- und Nierenschnitten und Rattendarm gemacht. Unter der Voraussetzung, dass die Inkubation der Gewebschnitte im wesentlichen den Verhältnissen im Organismus entsprechen, würde das die Umwandlung bewirkende Enzymsystem im Verlaufe von 24 h etwa 75% des anwesenden Parathions zu Paraoxon überführen.

klärung ihres Wirkungsmechanismus erscheint deshalb von besonderem Interesse.

Eine direkte Wirkung gegenüber dem beim Schock freigesetzten Histamin oder eine Änderung der Histaminreaktivität ist auszuschliessen, da mit Polysacchariden behandelte Meerschweinchen wie auch die isolierten Organe solcher Tiere die gleiche Histaminempfindlichkeit wie unbehandelte aufweisen. Es ist jedoch nicht auszuschliessen, dass andere mit der Anaphylaxie möglicherweise in Zusammenhang stehende humorale Faktoren wie 5-Hydroxytryptamin⁴ durch Polysaccharide beeinflusst werden; so wird das durch 5-Hydroxytryptamin-Aerosol erzeugte Asthma beim Meerschweinchen⁵ abgeschwächt. Die Wirksamkeit der Polysaccharide in diesem Test genügt jedoch nicht zur Erklärung der antianaphylaktischen Wirkung.

Wie andere bakterielle Polysaccharide bewirken auch die von uns untersuchten am Kaninchen eine nach relativ kurzer Zeit einsetzende Leukopenie, die durch relativ hohe Dosen eines Sympathikolytikums (Regitin) ebenso wenig gehemmt wird wie die bekannte Erhöhung der Rektaltemperatur; von HUMPHREY⁶ ist gezeigt worden, dass eine allerdings auf andere Weise (Anti-Leukozyten-Serum) erzielte Leukopenie für die Hemmung des Arthusphänomens verantwortlich ist. Die Leukopenie kann aber kaum die alleinige Ursache der Wirksamkeit der Polysaccharide sein, indem nach wenigen Stunden eine Leukozytose mit Neutrophilie folgt, trotzdem eine einmalige Behandlung mit wirksamen Polysacchariden das Arthusphänomen während 48 h unterdrückt, das heisst während der vollen Dauer seiner möglichen Ausbildung.

Dass andere bekannte Auswirkungen der Polysaccharide, wie etwa Blutdrucksenkung oder Stimulation der Nebennierenrinde für die Schutzwirkung gegenüber den anaphylaktischen Reaktionen verantwortlich sind, erscheint vorläufig unwahrscheinlich, weil weder das blutdrucksenkende Hydralazin noch Corticosteroide eine vergleichbare Wirkung entfalten. Es erscheint dagegen nicht unwahrscheinlich, dass Beziehungen zu dem durch Typhusbazillen hervorgerufenen Zustand der «Promunität»⁷ und zum sogenannten Properdinsystem⁸ bestehen.

Polysaccharide dürften somit einen besonderen und komplexen, aus variablen Einzelkomponenten resultierenden Wirkungsmechanismus besitzen. Dies dürfte sich auch in ihrem Verhalten am Arthusphänomen zeigen, indem einzelne Polysaccharide nur einzelne Komponenten dieser besonderen Form der allergischen Entzündung (zum Beispiel Ödem, Blutung) hemmen oder sekundär zu einer Verstärkung führen können.

Ebenso komplexer Natur erscheint die Wirkung der Polysaccharide bei Prüfung am sogenannten Schwartzman-Phänomen (Kaninchen), indem sie je nach den Versuchsbedingungen sowohl präparatorische als auch provokatorische Eigenschaften besitzen und zudem das Phänomen selbst hemmen können. (Vgl. ALECHINSKY'S Versuche mit Filtraten von Colikulturen.⁹)

Eine einfache «Immunisierungsreaktion» kann ebenso nicht die Ursache der antianaphylaktischen Wirkung sein. Die Polysaccharide sind in Dosen, die ein Vielfaches

⁴ J. H. HUMPHREY und R. JAQUES, J. Physiol. 119, 43 P (1955); 128, 9 (1955).

⁵ H. HERXHEIMER, J. Physiol. 120, 65 P (1953).

⁶ J. H. HUMPHREY, Brit. J. exper. Path. 36, 268 und 283 (1955).

⁷ J. ORSKOV und F. KAUFFMANN, Z. Hyg. 119, 65 (1936).

⁸ G. PILLEMER, M. D. SCHOENBERG, L. BLUM und L. WURZ, Science 122, 545 (1955).

⁹ A. ALECHINSKY, Ann. Inst. Pasteur 82, 412 (1952).

Antiallergische Wirkung bakterieller Polysaccharide

In früheren Arbeiten unseres Laboratoriums wurde die spezifische Wirkung bakterieller und anderer Polysaccharide auf die Chemotaxis der Leukozyten¹, die entzündlichen Reaktionen des Bindegewebes in Form des Fremdkörpergranuloms² und auf verschiedene Infektionsphänomene³ beschrieben. Auf Grund der vorliegenden Befunde schien es angezeigt, festzustellen, ob derartige Polysaccharide imstande sind, andere Reaktionen des mesenchymalen Apparates, besonders anaphylaktische Phänomene, ebenfalls zu beeinflussen.

Es ergab sich, dass in bestimmter Weise aufgearbeitete Polysaccharide aus Bakterien die Erscheinungen eines typischen anaphylaktischen Schocks beim Meerschweinchen (Eieralbumin als Antigen, intravenös verabreicht) hemmen. Im allgemeinen wurden die Polysaccharide eine Stunde vor Auslösung des Schocks intraperitoneal injiziert. Einzelne der im anaphylaktischen Schock des Meerschweinchens wirksamen Präparate unterdrücken überdies das beim sensibilisierten Kaninchen durch Pferdeserum ausgelöste Arthusphänomen (intravenöse Injektion 1 h vor der intrakutanen Injektion des Antigens). Zwischen der Wirkung in beiden Testen scheinen in dem verwendeten Dosenbereich keine gesetzmässigen Wechselbeziehungen zu bestehen, indem gewisse Polysaccharidpräparate entweder im einen Falle wirksam waren und nicht im andern, dagegen andere in beiden wirkten.

Die für eine Hemmung der allergischen Phänomene benötigten Dosen von Polysacchariden sind gering, indem 0,1–0,5 mg/kg i. p. und 0,1–1 γ/kg i. v. beim anaphylaktischen Schock und nur 0,01–0,05 mg/kg i. v. beim Arthusphänomen genügen. Sie sind wirksamer als bekannte Antiallergika, da Pyribenzamin als ein typischer Vertreter der Antihistaminika erst in etwa 10 bzw. 1000mal höheren Dosen den anaphylaktischen Schock hemmt und auch in noch höheren Dosen bei Prüfung am Arthusphänomen wirkungslos ist. Die Auf-

¹ R. MEIER, Z. exper. Med. 87, 283 (1933). — R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 9, 93 (1953); 10, 376 (1954).

² R. MEIER, P. A. DESAULLES und B. SCHÄR, Arch. exper. Path. Pharm. 224, 104 (1955).

³ R. MEIER und L. NEIPP, Schweiz. med. Wschr. 86, 249 (1956). — R. MEIER und F. KRADOLFER, Exper. 12, 213 (1956).