

antagonist on the isolated rabbit ileum compound, No. 16 is 1.44% (1.07-1.94%) as active as atropine sulfate. The other compounds listed are less active or inactive in these experimental conditions³. E.g. amidone: 0.50 (0.37-0.68%); pethidine: 0.30 (0.22-0.41%); morphine: < 0.1%.

Investigation into various aspects of this problem is being pursued; the results will be published in detail elsewhere.

Acknowledgment. The authors wish to express their gratitude to A. F. GREEN (Beckenham) and A. POHLAND (Indianapolis) for samples of the compounds No. 6 and No. 19 resp., and to J. HUYGENS and R. FREDERICKX for their splendid technical assistance.

P. A. J. JANSEN and A. JAGENEAU

Research Laboratory Eupharma, Pharmaceutical Laboratories Dr. J. C. Janssen, Turnhout (Belgium), April 17, 1956.

Résumé

Dans une série de 20 analgésiques puissants nous avons trouvé une corrélation hautement significative entre l'activité analgésique et mydiatique chez la souris.

³ D. K. DE JONGH, E. G. VAN PROOSDIJ-HARTZEMA, and P. JANSEN, Arch. int. Pharmacodyn. 103, 100 (1955).—E. G. VAN PROOSDIJ-HARTZEMA, P. JANSEN, and D. K. DE JONGH, Arch. int. Pharmacodyn. 103, 120 (1955).

Glukose als Cofaktor bei der Retraktion des Blutgerinnsels

Vor kurzem wurde mitgeteilt¹, dass zur Auslösung der Retraktion eines plättchenhaltigen Fibringerinnsels Thrombin und ein dialysierbarer Faktor aus Plasma oder Serum erforderlich sind.

Seither konnte festgestellt werden, dass die aktive Komponente aus Dialysat weder von Kationen- noch Anionenaustauscherharzen zurückgehalten wird. Derart entsalzte Dialysate wurden der Papierchromatographie² mit Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) unterworfen. Die aktive Komponente konnte eluiert und als Glukose identifiziert werden.

Schon früher wurde festgestellt³, dass die Retraktion in einem ungepufferten «Minimalsystem» aus Plättchen, Fibrinogen, Dialysat aus Plasma und Thrombin mit einem Absinken des pH-Wertes verbunden ist. Nunmehr wurde gefunden, dass die bei Glukose-Anwesenheit gebildeten Säremengen innerhalb bestimmter Grenzen proportional dem Retraktionseffekt sind. Die gebildete Säure konnte als Milchsäure identifiziert werden, so dass offensichtlich glykolytische Prozesse im Thrombozyten auf das engste mit dem Retraktionsmechanismus verknüpft erscheinen. Die Beziehung zwischen zugesetzter Glukose und gebildeter Säure ist komplizierterer Natur; insbesondere wurde gefunden, dass mit Thrombin allein inkubierte Plättchen ebenfalls schon geringe Mengen Milchsäure zu produzieren vermögen, was auf einen natürlichen Kohlehydratgehalt der Plättchen schliessen lässt. Zur Auslösung der Retraktion genügen

¹ E. F. LÜSCHER, Exper. im Druck (1956); Vox Sanguinis 1, 133 (1956).

² S. M. PARTRIDGE, Biochem. J. 42, 238 (1948).

³ E. F. LÜSCHER, Vox Sanguinis 1, 133 (1956).

diese geringen plättcheneigenen Kohlehydratmengen in der Regel nicht. Immerhin mögen sie eine Erklärung dafür bieten, wieso die «viskose Metamorphose» der Plättchen oft schon beim blosen Kontakt mit Thrombin manifest wird, ohne jedoch mit dem von uns bisher benutzten Retraktions-Hemmungstest³ fassbar zu werden.

Weitere Arbeiten zur Abklärung der Beziehungen zwischen Fermentaktivität der Plättchen und Retraktion sind im Gange.

E. F. LÜSCHER

Theodor-Kocher-Institut und Physiologisches Institut der Universität Bern, den 23. Juni 1956.

Summary

Dextrose is found to be a co-factor for clot retraction. During retraction lactic acid is produced, suggesting a close relationship between enzymatic activity of the platelets and the retraction-mechanism.

Über die Wirkung von Phenylbutazon auf den Tricarbonsäurezyklus und andere Fermentsysteme

Über die Wirkung von Phenylbutazon (1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-4-n-butyl-pyrazolidin = Butazolidin Geigy) auf spezifische Fermentsysteme *in vitro* liegen bis heute nur vereinzelte Angaben vor. Eine Zusammenstellung der Literatur über diesen Fragenkomplex erscheint in einer besonderen Mitteilung¹.

Unsere Versuche gingen von der Frage aus, ob die entzündungshemmende Wirkung des Phenylbutazons mit dem Stoffwechsel der Polysaccharide der Grundsubstanz verknüpft sei. *In vitro*-Versuche mit Hyaluronidase (siehe auch GIALDRONI und GRASSI²; AGOLINI und Mitarbeiter³ und DOMENJOZ⁴) und Chondroitinase verliefen negativ (Phenylbutazonkonzentrationen von 10^{-3} m entsprechend 31,8 mg%). Wir untersuchten ferner den Einfluss von Phenylbutazon auf die β -Glucuronidase (Technik von TALALAY und Mitarbeitern⁵) und die Cholinesterase (Methode nach AMMON⁶), ohne einen Hemmeffekt zu beobachten ($c = 10^{-3}$ m).

Im Hinblick auf die zentrale Stellung des Tricarbonsäuresystems im Stoffwechsel befassten wir uns ferner mit der Wirkung des Phenylbutazons auf die Zwischenstufen des Krebs'schen Zylkus.

Methoden. Die Darstellung der Mitochondrien aus Rattenleber geschah nach der Methode von LEUTHARDT und MÜLLER⁷. Bei einigen Versuchen wurde diesen Ansätzen noch Glykolkomplexon (Äthylenglykol-bis- β -amino-äthyl-äther-N, N'-tetraessigsäure = schweiz. Pat.

¹ R. PULVER, B. EXER und B. HERRMANN, Schweiz. med. Wschr. 86 (1956) (im Druck).

² G. GIALDRONI und C. GRASSI, Boll. Soc. Ital. Biol. sper. 28, 1580 (1952).

³ G. AGOLINI, A. BERTELLI und G. CAVICCHINI, Boll. Soc. Ital. Biol. sper. 28, 1761 (1952).

⁴ R. DOMENJOZ, Arch. exp. Path. Pharm. 225, 14 (1955).

⁵ P. TALALAY, W. H. FISHMAN und CH. HUGGINS, J. biol. Chem. 166, 757 (1946).

⁶ R. AMMON, Arch. ges. Physiol. 233, 468 (1933).

⁷ F. LEUTHARDT und A. F. MÜLLER, Exper. 4, 278 (1948).

294554) in einer Endkonzentration von 10^{-4} m zugesetzt (RAAFLAUB⁸).

Die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte manometrisch im Warburg-Apparat bei 38° mit Luft im Gasraum.

Zur Oxydation des Pyruvats wurde das von LEUTHARDT und MAURON⁹ beschriebene Versuchsmilieu verwendet. Um die Versuchsbedingungen gleichzuhalten,

0,2 ml Mitochondriensuspension

0,25 ml Pyruvat oder andere Säuren des Tricarbon säurezyklus $0,05 \text{ m}$.

Wasser, Phenylbutazon oder andere Zusätze wurden bis zu einem Gesamtvolumen von 1,65 ml zugegeben. Zur Absorption der Kohlensäure wurde ein gefaltetes Filterpapier ($4 \times 1 \text{ cm}$) mit 0,1 ml Natronlauge 2n in den Zentralzylinder gesteckt.

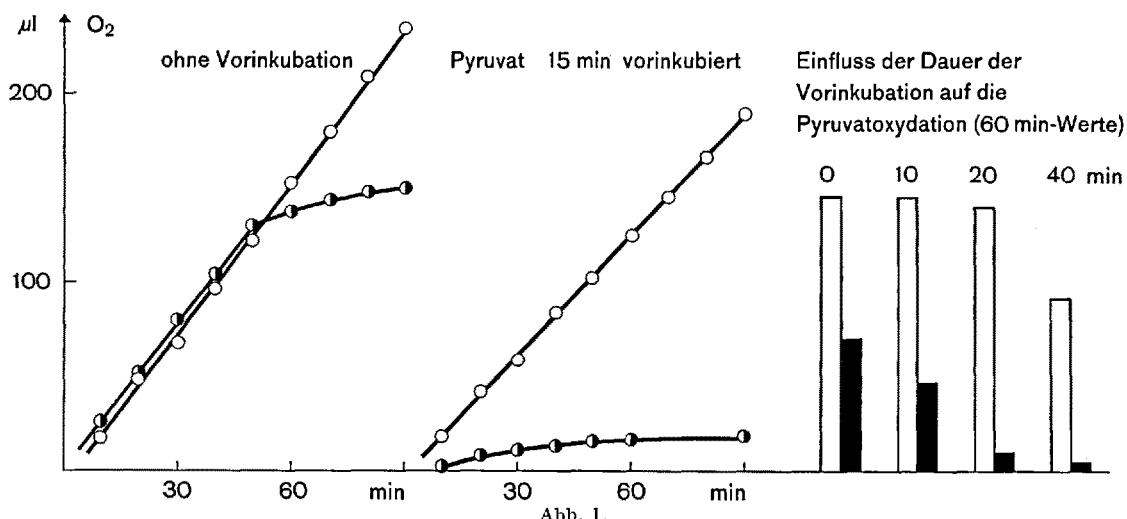
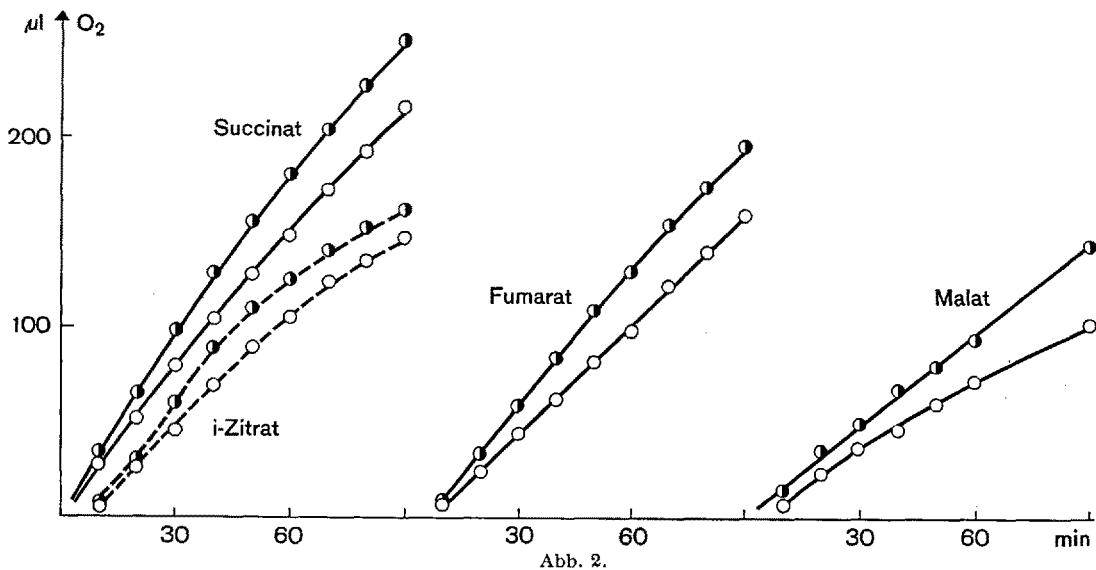


Abb. 1.

wurde auch zur Oxydation der anderen Substrate das gleiche Milieu gewählt. Entsprechend den vorhandenen Warburggefäßsen wurde das Volumen des Ansatzes auf 1,65 ml reduziert.

Die Versuche wurden auf zwei Arten ausgeführt. Entweder wurde der ganze Ansatz in den Hauptraum pipettiert und die erste Ablesung nach 10 min ausgeführt, oder es wurde das Substrat in den Seitenarm eingefüllt



Weisse Kreise und weisse Säulen = Kontrollen; schwarz-weisste Kreise und schwarze Säulen = Phenylbutazon $3 \cdot 10^{-4} \text{ m}$.

Der Ansatz enthielt jeweils:
 0,4 ml von 0,04 m Phosphatpuffer, pH 7,4
 0,2 ml Magnesiumsulfat 0,1 m
 0,2 ml Kaliumchlorid 0,5 m
 0,1 ml KCl isotonisch
 0,15 ml Adenosintriphosphat 0,01 m

und erst nach 15 min zum Ansatz zugekippt, wobei die erste Ablesung vor dem Kippen erfolgte. Der Sauerstoffverbrauch der Kontrollen ohne Substrat betrug in 90 min etwa 30 μl und wurde in den späteren Versuchen nicht mehr bestimmt.

Resultate. Phenylbutazon beeinflusst die verschiedenen Umsetzungen des Zitronensäurezyklus je nach Konzentration teils aktivierend, teils hemmend.

Die Oxydation der Brenztraubensäure (Abb. 1) wird durch Phenylbutazon (wirksame Endkonzentration

⁸ J. RAAFLAUB, Helv. chim. Acta 38, 27 (1955).

⁹ F. LEUTHARDT und J. MAURON, Helv. physiol. pharmacol. Acta 8, 386 (1950).

$3 \cdot 10^{-4} M$) gehemmt. Durch Vorinkubation der Mitochondrien mit Phenylbutazon und ohne Substrat lässt sich die Hemmung der α -Ketosäureoxydation verstärken. Eine gleichartige Behandlung der Kontrollen (ohne Phenylbutazon) schädigt bei kurzer Inkubationsdauer die Mitochondrien nur geringfügig, denn der Sauerstoffverbrauch nach Zukippen des Substrates ist nur wenig herabgesetzt (Abb. 1). Zusätze von Diphosphopyridin-nukleotid ($2,5 \cdot 10^{-4} M$), Coccoxylase ($3,5 \cdot 10^{-4} M$), $Mn^{++} 3 \cdot 10^{-4} M$, Cytochrome *c* ($4 \cdot 10^{-4} M$) und Thyroxin ($8,6 \cdot 10^{-4} M$) haben keinen Einfluss auf die Veratmung des Pyruvates. Auch nach Vorinkubation ohne Substrat lässt sich kein Einfluss dieser Faktoren feststellen. Die erwähnten Wirkstoffe können auch die Hemmung der Atmung durch Phenylbutazon nicht aufheben.

Die Oxydation der iso-Zitronensäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure wurde durch Phenylbutazon ($3 \cdot 10^{-4} M$) nicht gehemmt. In vielen Fällen wurde der Abbau sogar beschleunigt (Abb. 2).

Die Oxydation der Zitronensäure wurde in verschiedenen Versuchsreihen teils gehemmt, teils beschleunigt, was wir der verschiedenen Herkunft der verwendeten Ratten zuschreiben möchten. Die Empfindlichkeit der einzelnen Mitochondriensuspensionen auf Phenylbutazon ($3 \cdot 10^{-4} M$) war, trotz einer im Kontrollversuch gleich starken enzymatischen Aktivität, verschieden; wurde Ketoglutarat als Substrat verwendet, so konnten vorübergehende Aktivierungen, die aber bald in eine komplette Hemmung umschlugen, beobachtet werden. Versuche zeigten, dass die Dauer der initialen Aktivierung der α -Ketoglutaratoxydation bei steigender Phenylbutazonkonzentration immer kürzer wird; oberhalb 25 mg% wurden nur noch Inaktivierungen beobachtet¹. Die zuletzt erwähnten Versuche wurden ohne Vorinkubation durchgeführt.

B. EXER

Aus den pharmakologischen Laboratorien der J. R. Geigy AG., Basel, den 30. April 1956.

Summary

Cholinesterase, hyaluronidase, chondroitinase and β -glucuronidase are not inhibited by phenylbutazone in concentrations up to $10^{-3} M$.

Phenylbutazone accelerates the oxidation of the acids of the Krebs cycle in therapeutic concentrations up to 10 mg%; in higher concentrations it acts as an inhibitor. The inhibition of the α -keto acid oxidation begins at lower concentrations of phenylbutazone than for the other intermediates.

Synaptic Connections of Ib Muscle Afferents to Ventral Spinocerebellar Tract Neurons

The ventral spinocerebellar tract (v.s.c.t.) has been mapped mainly through neuro-anatomical work, and the results from a recent electrophysiological analysis¹ conform with the classical concepts. Experiments are reported here showing activation of v.s.c.t. neurons by group Ib muscle afferents, thus suggesting excitatory action by Golgi tendon organ afferents.

¹ R. M. E. CARREA and H. GRUNDFEST, J. Neurophysiol. 17, 208 (1954).

The experiments were performed on decerebrate cats. Contralateral muscle nerves from the hindleg were stimulated with single shocks and the mass discharge in the v.s.c.t. was recorded by a surface electrode placed on the exposed superior cerebellar peduncle. The ingoing volley was judged by triphasic recording from the dorsal roots, and only cats with group Ia and Ib separation were used². Such an experiment is illustrated in Figure 1.



Fig. 1.—Activation of the v.s.c.t. with group Ib. Stimulation of the contralateral quadriceps nerve. Superposed records of simultaneous recordings from dorsal root (LV, lower records) and from the v.s.c.t. at the superior cerebellar peduncle.

With the maximally obtainable pure group Ia volley, no mass discharge is to be seen (record 1). The addition of a small part of group Ib already results in activation of v.s.c.t. neurons (record 2). The discharge is well synchronized and appears after 5 ms. It increases with activation of more afferents in group Ib. The appearance of group II (record 4) represented by a small hump after group I in the dorsal root record, does not seem to have any influence on the discharge.

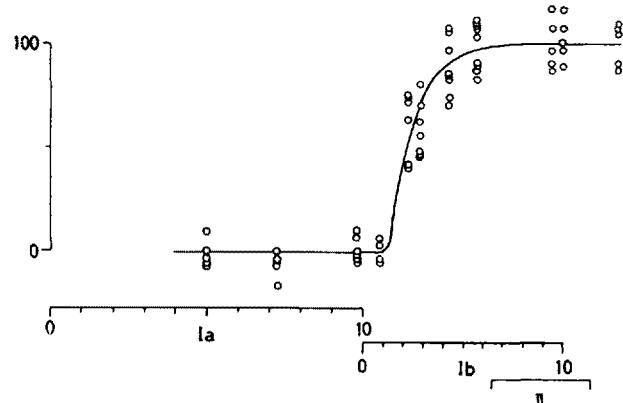


Fig. 2.—A curve showing the activation of the v.s.c.t. with group Ib. Stimulation of the contralateral hamstring nerve. Several records were taken with each stimulus strength. For explanation see the text.

The potentials recorded in a similar experiment are plotted to give the curve of Figure 2. The ordinate represents the mass discharge in the v.s.c.t. and the abscissa the dorsal root volley with separate measurements for the magnitude of the group Ia and Ib potentials. The beginning of group II was assessed by separate recordings from a root filament at the end of the experiment.

² K. BRADLEY and J. C. ECCLES, J. Physiol. 122, 462 (1953).—J. C. ECCLES, P. FATT, S. LANDGREN, and G. J. WINSBURY, J. Physiol. 125, 590 (1954).