

thorax in *Drosophila funebris* with age by WATANABE and WILLIAMS⁶. In view of HIGGINS *et al.*'s demonstration⁷ that in rat liver CoA is mostly contained in the mitochondria, the present data and those of WATANABE and WILLIAMS may together indicate indirectly that CoA is also chiefly localized in the sarcosomes in insects.

M. BOCCACCI and S. BETTINI

Department of Parasitology, Istituto Superiore di Sanità, Roma, July 4, 1956.

Riassunto

Gli autori hanno dosato il CoA nei muscoli della coxa di *Periplaneta americana* ed in *Musca domestica* in toto. Vengono messe in evidenza le differenze del contenuto in CoA dei muscoli bianchi e rossi della coxa di blatta. Viene inoltre messo in evidenza l'aumento progressivo del CoA, durante i primi 9 giorni di vita dell'adulto, in *M. domestica*.

⁶ M. I. WATANABE and C. M. WILLIAMS, J. Gen. Physiol. 37, 71 (1953).
⁷ H. HIGGINS, J. A. MILLER, J. M. PRICE, and F. M. STRONG, Proc. roy. Soc. exp. Biol. Med. 75, 462 (1950).

Über den Einfluss von Organextrakten auf den Sauerstoffverbrauch von Geweben

Untersuchungen an Leber- und Herzschnitten gesunder und skorbutkranker Meerschweinchen

Wir untersuchten den O₂-Verbrauch von Herz- und Leberschnitten gesunder und skorbutkranker Meerschweinchen und seine Veränderungen durch den Zusatz von Organextrakten. Als solche verwendeten wir den Gesamtherzextrakt «Recosen» und den Leberextrakt «Ripason».

Die Ergebnisse klinischer Untersuchungen mit diesen Extrakten haben ihre therapeutische Verwendung bestimmt. Die Schaffung experimenteller Grundlagen begegnet verschiedenen Schwierigkeiten, vor allem wenn solche Untersuchungen einer experimentellen Sicherung der klinischen Erfahrung dienen sollen, dass Extrakte bestimmter Organe besonders auf jene Organe wirken, aus denen sie gewonnen wurden. Zur Abklärung dieser Frage soll die folgende Mitteilung beitragen.

Methodik. Die Bestimmung des O₂-Verbrauches wurde in der Warburg-Apparatur unter Verwendung von Krebs-Ringer-Lösung durchgeführt. In den Gefässen befand sich ein Gesamtvolumen von 2 ml. Es wurden dünnste Rasiermesserschnitte aus Herz und Leber frisch getöteter Meerschweinchen verwendet. Die Zahl der Schnitte wurde so gewählt, dass das Gesamtrockengewicht des untersuchten Materials zwischen 4 und 8 mg lag. Der Skorbut wurde nach SHERMAN, LA MER und CAMPBELL¹ erzeugt und die Tiere nach dem 20. Skorbutdiättag während des grössten Gewichtsabsturzes getötet. Zur Sicherung eines vorliegenden Skorbutus wurde der Vitamin-C-Gehalt der Nebennieren nach TILLMANN² (Dichlorphenolindophenol-Titration) bestimmt. Dieser war bei allen verwendeten Skorbuttieren nahezu Null.

¹ H. C. SHERMAN, V. K. LA MER und H. L. CAMPBELL, J. Amer. chem. Soc. 44, 165 (1922).
² J. TILLMANN, Z. Lebensmittelforsch. 63, 1 (1932).

Die zur Untersuchung kommenden Organextrakte wurden so zugegeben, dass im Hauptraum eine Extraktkonzentration von 1:100 bestand.

In Voruntersuchungen wurde zunächst der Sauerstoffverbrauch von unbeeinflussten Herz- und Lebergeweben normaler und skorbutkranker Meerschweinchen ermittelt. Die Ergebnisse aus je 64 Bestimmungen an Gewebsschnitten von je 22 Versuchstieren zeigt die Tabelle I:

Tabelle I
O₂-Verbrauch (μl/mg Trockengewicht) von Meerschweinchengewebe

	nach 20 min	nach 40 min	nach 60 min
<i>Herzgewebe</i>			
Normaltiere	2,3	4,6	6,8
Skorbuttiere	2,6	5,1	7,4
<i>Lebergewebe</i>			
Normaltiere	3,9	7,4	10,5
Skorbuttiere	4,3	8,0	11,3

Es ist zu ersehen, dass sowohl Herz- als auch Lebergewebe skorbutkranker Meerschweinchen in der gleichen Zeit mehr Sauerstoff verbrauchen als die entsprechenden Gewebe gesunder Versuchstiere. Lebergewebe ist im Sauerstoffverbrauch erheblich aktiver als Herzgewebe. In allen Versuchen wird deutlich sichtbar, dass der Sauerstoffverbrauch stetig zunimmt, so dass eine lineare Beziehung zwischen Sauerstoffverbrauch und Zeit zustande kommt. Die Ergebnisse stimmen mit den Angaben von KREBS³ über den Q O₂ bei Normaltieren überein.

Wir haben die Gewebe von Herz und Leber der beiden Tiergruppen in weiteren Versuchen von vornherein mit den beschriebenen wässrigen Organextrakten in Berührung gebracht und den Sauerstoffverbrauch in je 61 Messungen an 18 Geweben verschiedener Tiere für jeden Extrakt gemessen. Die Ergebnisse fasst die Tabelle II zusammen.

Tabelle II
Q O₂ (O₂-Verbrauch in μl/mg Trockengewicht in 60 min)

	<i>Herzgewebe</i>		<i>Lebergewebe</i>	
	normal	Skorbut	normal	Skorbut
1. ohne Zusatz. . . .	6,8	7,4	10,5	11,3
2. mit Herzextrakt . .	8,4	10,0	12,0	12,8
3. mit Leberextrakt . .	7,4	8,5	13,5	14,3
4. mit Magen-Dünndarm-Extrakt . .	7,6	8,9	12,0	13,3

Das Resultat dieser Prüfung ist, dass alle von uns verwendeten Organextrakte den Sauerstoffverbrauch von Gewebsschnitten aus Herz und Leber sowohl gesunder als auch skorbutkranker Meerschweinchen steigern. Es fällt auf, dass die Atmung des Herzgewebes beider Tiergruppen besonders stark durch den Herzextrakt, und die Atmung des Lebergewebes ebenso durch den Leberextrakt gesteigert wird.

Wir haben die gesamten Messergebnisse einer statistischen Prüfung durch den Fischerschen *t*-Test unterzogen. Die Werte der Wahrscheinlichkeit *P*, die die Sicherheit eines Unterschiedes der Messergebnisse angeben, sind in Tabelle III zusammengefasst. Die Ver-

³ H. A. KREBS, Biochem. biophys. Acta 4, 249 (1950).

hältniszahlen beziehen sich auf die in Tabelle II erwähnten Versuchsreihen. Es bedeutet zum Beispiel 1:2, dass die Gewebsatmung ohne Zusatz, mit der Atmung nach Herzextraktzusatz verglichen wird.

Tabelle III

Wahrscheinlichkeit P eines Unterschieds der Ergebnisse aus Tabelle II

Vergleich	Herzgewebe			Lebergewebe	
	normal P	Skorbut P		normal P	Skorbut P
1:2	< 0,001	< 0,001	1:2	< 0,05	< 0,05
1:3	< 0,1	< 0,1	1:3	< 0,001	< 0,001
1:4	< 0,05	< 0,05	1:4	< 0,05	< 0,02

Die Tabelle III legt klar, dass die höchste Wahrscheinlichkeit eines Unterschieds der Messergebnisse (P 0,001) beim Sauerstoffverbrauch von Herzschnitten beider Versuchsgruppen nur vom Herzextrakt, bei den Leberschnitten nur vom Leberextrakt erreicht wird. Die Steigerung der Atmung durch die anderen Extrakte ist weniger gesichert.

G. GRUPP und F. C. ROULET

Pharmakologisches Institut der Universität Freiburg
i. Br. und Versuchsabteilung der Robapharm Laboratoriums AG., Basel, den 1. August 1956.

Résumé

1° La consommation en O_2 des tissus cardiaque et hépatique de cobayes sains et atteints de scorbut est augmentée par l'apport de différents extraits organiques (extraits de cœur, foie et estomac-intestin). L'extrait de cœur augmente fortement la respiration des coupes du muscle cardiaque et l'extrait de foie celles des coupes du foie (ceci est prouvé d'une manière significative par les statistiques).

2° La respiration de coupes de tissus de cobayes atteints de scorbut est plus forte que celle d'animaux d'expériences sains.

3° Ces résultats soulignent le fait que les extraits d'organes exercent une influence particulière sur les tissus dont ils proviennent.

Inhibition sélective des « vraies » et « pseudo »-cholinestérases du rectus de grenouille

On sait que les cholinestérases des muscles striés sont essentiellement représentées par des cholinestérases dites « vraies » (AcChE)¹.

Toutefois, il a été montré que le diaphragme de rat contient aussi un enzyme se comportant comme une pseudo-cholinestérase (XChE)².

Dans le cas du rectus de grenouille, plusieurs incertitudes subsistent. COHEN et POSTHUMUS³ ont montré que

¹ G. B. KOELLE, J. Pharmacol. 100, 158 (1950). – V. B. BROOKS et D. K. MYERS, J. of Physiol. 116, 158 (1952).

² A. N. DAVISON, Biochem. J. 54, 583 (1953). – F. A. DENZ, J. exp. Path. 34, 329 (1953). – J. M. BARNES et J. I. DUFF, Brit. J. Pharmacol. 8, 334 (1953).

³ J. A. COHEN et C. H. POSTHUMUS, Acta physiol. pharmacol. Neerl. 4, 17 (1955).

des extraits de ce muscle sont capables d'hydrolyser non seulement l'acétylcholine mais aussi la butyrylcholine, cette dernière très lentement; on ne sait cependant pas si ces hydrolyses sont réalisées par un seul enzyme ou par des estérases différentes. – D'autre part, dans une note antérieure⁴ nous avons observé, avec des anticholinestérases sélectifs, des potentialisations préférentielles, tantôt de l'acétylcholine, tantôt de la butyrylcholine, mais des mécanismes de potentialisations non enzymatiques ont été invoqués, en particulier dans le cas de la butyrylcholine, par COHEN et POSTHUMUS.

Dans ce travail nous avons recherché:

- si les hydrolyses de l'acétylcholine et de la butyrylcholine pouvaient ou non être attribuées à des enzymes différents, et cela en déterminant leur sensibilité à divers anticholinestérases (néostigmine, 3318 CT, D.F.P.);
- s'il existait ou non une corrélation satisfaisante entre les activités inhibitrices de ces substances et leurs pouvoirs potentialisateurs.

Nos essais ont été réalisés avec la méthode manométrique de WARBURG-AMMON. – Les extraits musculaires étaient obtenus par congélation à -25°C , puis broyage dans un mortier, et enfin suspension dans du bicarbonate de sodium 0,025 M ; leur concentration terminale était de 1/15. – Les substrats étaient du chlorure d'acétylcholine 0,01 M et du perchlorate de butyrylcholine 0,03 M . – Les solutions de 3318 CT et de néostigmine étaient préparées extemporanément; celles de D.F.P. l'étaient, chaque jour, à partir d'une solution stock à 2% dans du propylène glycol. – Dans une première série d'essais (*in vitro*), l'inhibiteur était ajouté à l'extrait musculaire 1 h avant l'addition du substrat; dans une deuxième série (*in vivo*), réalisée seulement avec le D.F.P., l'inhibiteur était ajouté au bain où plonge le muscle lui-même; on le laissait, comme dans les essais de potentialisation, 30 min au contact de la préparation qui était ensuite lavée à deux reprises avant d'être congelée et broyée.

Nous signalerons tout d'abord que les extraits de rectus ont fourni les dégagements de CO_2 moyens suivants: avec l'acétylcholine 0,01 M : 48,4 mm^3 par h et pour 0,1 g de muscle (déviations standard: 16,2); et avec la butyrylcholine 0,03 M : 13,4 mm^3 par h et pour 0,1 g de muscle (déviations standard: 2,8). Ces valeurs concordent avec celles fournies par COHEN et POSTHUMUS³. Elles permettent de calculer que la dose contracturante moyenne de chlorure d'acétylcholine (25 γ) peut être hydrolysée en environ 2 min par un rectus de 200 mg, et celle de perchlorate de butyrylcholine (15 γ) en environ 3 min; la contraction du rectus se développant en 3 à 5 min, une hydrolyse limitatrice très importante peut donc, *a priori*, intervenir aussi bien pour la butyrylcholine que pour l'acétylcholine.

Les deux hydrolyses sont inhibées de façon sensiblement égales par la néostigmine dont les CI_{50} sont respectivement de $1,1 \cdot 10^{-7} M$ dans le cas de l'acétylcholine et de $1,5 \cdot 10^{-7} M$ dans celui de la butyrylcholine.

Par contre, des inhibitions très nettement préférentielles sont obtenues avec le 3318 CT (fig. 1) et avec le D.F.P. (fig. 2).

Le 3318 CT – qui, avec d'autres préparations enzymatiques, est un anti-AcChE sélectif (JACOB⁵) – est un

⁴ J. JACOB et M. DECHAVASSINE, Exper. 11, 235 (1955).

⁵ J. JACOB, Exper. 10, 33 (1954); Arch. int. Pharmacodyn. 101, 446 (1955).