

Inhibiteurs ajoutés à l'Hb avant l'Hp

Réactif ajouté	p-Cl-mercuribenzoat					Hg ⁺⁺	Ag ⁺⁺	Cu ⁺⁺			
Atomes ou Moles d'inhibiteur par M d'Hb	1	2	3	4	8	8	16	89	400	800	4000
Inhibition en %	0	0	7	7,5	15	7,5	13	0	0	6	79

sont avec deux atomes de Hg⁺⁺ et deux molécules de pcmb. L'hémoglobine de cheval préparée par nous⁷ réagit bien avec deux molécules de pcmb (méthode spectrophotométrique de BOYER) mais seulement avec 1,5 atome de Hg⁺⁺ par 4 atomes de fer. La combinaison Hb-Hp obtenue en mélangeant l'haptoglobine (0,0075 μ M d'Hp dimère ou 0,015 μ M de Hp monomère) avec 0,015 μ M d'Hb dans un volume de 1 ml (eau ou tampon acétate 0,1 M, pH 4,5 sous azote) consomme la même quantité de Hg⁺⁺ que l'hémoglobine seul (titré dans le tampon phosphate KCl de KOLTHOFF *et al.*)⁸. Avec Ag⁺ les résultats sont moins bien reproductibles (pour les détails voir⁹). Ce n'est que 9 fois sur 16 déterminations que nous avons obtenu la fixation de 4 atomes d'Ag⁺ par 4 atomes de Fer dans le tampon ammoniacal ci-dessus mentionné. 5 déterminations ont donné des valeurs plus faibles (entre 2,5 et 3,1 atomes d'Ag⁺ par 4 atomes de Fe) et dans 2 autres on a obtenu des chiffres plus élevés (environ 6 atomes d'Ag par 4 atomes de Fe) comme en présence d'agents dénaturants (dodécylsulfate 8 mg). Ces discordances sont certainement dues à l'«effet ammoniacal» qui se manifeste peut-être davantage avec l'hémoglobine non cristallisée. Le complexe Hp-Hb consomme 2 à 3 atomes d'Ag⁺ par 4 atomes de Fe (dans 5 déterminations sur 7). En ajoutant le dodécylsulfate (8 mg/1,2 mg d'Hp) immédiatement après le titrage, le courant de diffusion baisse d'une quantité équivalente à une fixation supplémentaire d'Ag⁺, la somme correspondant environ à 4 atomes d'Ag⁺ par 4 atomes de Fe. Ceci peut indiquer l'affinité quelque peu diminuée d'une fonction thiol du complexe Hb-Hp pour l'Ag⁺, ce qui ne semble pas être le cas, pour les ions Hg⁺⁺.

3° *Inhibition de l'activité peroxydasique de la combinaison Hb-Hp par le Hg⁺⁺, Ag⁺, Cu⁺⁺ et Pcmb.* a) La combinaison Hb-Hp a vis-à-vis de l'oxydation de IK par l'hydroperoxyde d'éthyl une activité peroxydasique différente par son pH optimum et par sa cinétique de celle de l'hémoglobine; une méthode spécifique de dosage de l'haptoglobine, fondée sur ce principe, a été mise au point par l'un de nous⁶.

b) Les réactifs énumérés n'inhibent que très faiblement la formation et le pouvoir peroxydasique de Hb-Hp.

Pour l'étude de l'inhibition de la formation de la combinaison l'inhibiteur est ajouté à l'hémoglobine avant l'haptoglobine; pour l'étude de l'inhibition de l'activité peroxydasique de la combinaison l'inhibiteur est ajouté à la combinaison Hb-Hp.

L'iode n'inhibe pas non plus l'activité de la combinaison Hb-Hp. Par contre il inhibe légèrement l'activité peroxydasique de l'hémoglobine, on utilise cette propriété au cours du dosage de l'activité haptoglobinique des sérums (50 μ M d'iode pour 1,25–10⁻³ μ M Hb). L'haptoglobine fixe facilement 20 atomes d'iode par molécule d'hapto-

globine monomère. Cette protéine iodée conserve tout son pouvoir de combinaison vis-à-vis de l'hémoglobine et le complexe formé a une activité catalytique identique à celle du complexe non iodé¹⁰.

L. ROBERT, G. BOUSSIER et M. F. JAYLE

Service de Chimie, Faculté de Médecine, Paris, le 14 novembre 1956.

Summary

Free and masked SH groups were determined in haptoglobine (Hp) haemoglobine (Hb) (horse) and in their complex (Hb-Hp). Hp contains no free SH groups, but up to 9 groups are liberated per mol on denaturation by guanidine. The Hb-Hp complex reacts with the same number of Hg⁺⁺ ions as free Hb, but it reacts with one less Ag⁺ ion than free Hb. The 4th Ag⁺ ion is taken up only in the presence of low concentration of a denaturing agent. Hg⁺⁺, Ag⁺, Cu⁺⁺ pcmb and iodine do not inhibit the association of Hb and Hp nor do they diminish the peroxidasic activity of the complex. Sh groups of Hb do not seem to be involved in these two reactions.

¹⁰ J. MORETTI et CH. MICHON (à paraître).

Antagonismus zwischen Heparin und 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) *in vitro*

Nachdem kürzlich durchgeführte Untersuchungen¹ gezeigt hatten, dass Heparin die Histaminwirkung am isolierten, atropinisierten Meerschweinchenileum nicht beeinflusst, haben wir in der vorliegenden Untersuchung den Einfluss von Heparin auf die Wirkungen von 5-Hydroxytryptamin (5-HT) *in vitro* geprüft.

Methodik. Die Versuche wurden am isolierten Rattencolon (Methode nach DALGLIESH *et al.*²) und am mit Stilboestrol vorbehandelten Rattenuterus (Methode siehe bei GADDUM *et al.*³) durchgeführt. Der Suspensionsflüssigkeit (Volumen 10 ml) wurde zunächst wiederholt 5-HT (5-HT-Kreatininsulfat, Biochemicum Roche; 0,05–1,0 μ g) zugegeben, bis die Kontraktionen reproduzierbare, konstante Amplituden erreicht hatten. Nach dem üblichen Auswaschen wurde nun zunächst Heparin (Biochemicum Roche, 5%ige Lösung in einer der Badeflüssigkeit entsprechenden Tyrodelösung; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 ml) und anschliessend 5-HT zugefügt. Ebenso wurde die Wirkung einer vorher hergestellten Mischung aus 5-HT und Heparin (Testmenge 5-HT und 0,25, 0,5 oder 1,0 ml der Heparinlösung) untersucht. Schliesslich verfolgten

¹ R. KELLER und W. BURKARD, *Exper.* 10, 394 (1956).

² C. E. DALGLIESH, C. C. TOH und T. S. WORK, *J. Physiol.* 120, 298 (1953).

³ J. H. GADDUM, W. S. PEART und M. VOGT, *J. Physiol.* 108, 467 (1949).

⁷ M. F. JAYLE, *Bull. Soc. Chim. biol.* 33, 876 (1951).

⁸ I. M. KOLTHOFF, W. STRICKS et L. MORREN, *Analyt. Chem.* 26, 366 (1955).

⁹ B. ROBERT et L. ROBERT, *Bull. Soc. Chim. biol.* (sous presse).

wir in entsprechender Weise wie für Heparin auch den Einfluss von Glykogen bzw. Dextran (5%ige Lösung in einer der Badeflüssigkeit entsprechenden Tyrode; 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 ml) auf die Wirkung von 5-HT *in vitro*.

Ergebnisse

Rattencolon. Zugabe konstanter Mengen von 5-HT-Kreatininsulfat zum Bad in regelmässigen Zeitabständen führt zu den bekannten Kontraktionen des Colons. Wird dem Bad vorgängig Heparin in der erwähnten Dosierung zugefügt, so bleibt die übliche, auf 5-HT-Zugabe folgende Kontraktion aus oder sie ist wesentlich abgeschwächt. Die Verminderung der Amplitude ist der zugefügten Heparinmenge proportional; die zur Aufhebung der 5-HT-Wirkung notwendige Heparinmenge ist von Präparat zu Präparat verschieden.

Wird nach diesen Heparinzugaben und dem Auswaschen 5-HT wiederum allein zugegeben, so sind die Amplituden der Kontraktionen bei einem Teil der Präparate deutlich kleiner als diejenigen der Ausgangswerte. In diesem Falle werden die ursprünglichen Amplituden erst nach drei bis fünf 5-HT-Gaben wieder erreicht. Die gleichzeitige Verabreichung von 5-HT und Heparin in einer Mischlösung hat dieselben Resultate ergeben. Auch hier lässt sich in jedem Versuch eine dosisabhängige antagonistische Wirkung des Heparins zum 5-HT erkennen.

Wird statt Heparin eine Glykogen- oder Dextranlösung in der erwähnten Dosierung verabreicht, so werden die nachfolgenden 5-HT-Kontraktionen in keiner Weise beeinträchtigt; vorgängige Zugaben von Tyrodelösung verändern die 5-HT-Wirkung ebenfalls nicht.

Rattenuterus. In allen geprüften Präparaten hat Heparin zu einer Hemmung oder Aufhebung der 5-HT-Wirkung geführt, währenddem Tyrode, Glykogen oder Dextran keine Veränderungen bewirkten.

Nach Drucklegung erhielten wir Kenntnis von der Arbeit von G. and A. N. SMITH [Surgery, Gynecology and Obstetrics 101, 691 (1955)]. Diese Autoren fanden *in vivo* bei der experimentellen Lungenembolie der Katze und *in vitro* am Rattencolon ebenfalls einen Antagonismus zwischen Heparin und Serotonin.

R. KELLER

Institut für Hygiene und Arbeitsphysiologie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, den 10. Dezember 1956.

Summary

In the isolated rat colon and uterus, heparin caused inhibition or elimination of contractions occurring after the administration of 5-hydroxytryptamine. In contrast to this, neither Tyrode's solution, nor glycogen, nor dextran produced any change in the response of these organs to 5-hydroxytryptamine.

Investigation of the Physiologically Different Glycogen Fractions in Newborn Rabbits

There are numerous publications dealing with the physiological importance of the two glycogen fractions

found in animal tissues. MERRICK¹, for instance, established a correlation existing between the glycogen level of the heart muscle, the distribution of the glycogen fractions and the resistance to anoxia in several species of different degrees of phylogenetic development.

The resistance to anoxia definitely alters in the course of the ontogenetic development. It is a question whether the glycogen content of the tissues proves correspondingly different when assayed at an age exhibiting the greatest differences in resistance to anoxia. A comparison was made and in addition the effect of fasting and acute anoxia on the glycogen fractions was studied in rabbits, which species exhibits ten times greater resistance to anoxia in the newborn than in adults.

The total glycogen hydrolysable in KOH, the trichloroacetic acid soluble free glycogen and the protein-bound residual fraction show the following changes:

The correlation described by MERRICK, existing between anoxic resistance and heart-glycogen may also be established to some extent, as the newborn rabbit disposes of much greater stores during the first 24–48 h of life than the adult. A higher glycogen level is found not only in the heart muscle, but in all tissues investigated with the exception of the liver, such as the m. long. dorsi, m. biceps femoris, m. abdominis and the lung. (see table). There are no appreciable changes in the percentage distribution of the fractions in the age-groups investigated. Consequently the characteristic adult level is reached by the simultaneous decrease of the two fractions from the higher newborn level. The amount of the protein-bound glycogen in the white muscle remains unchanged in the course of development.

After fasting, the mobilisation of glycogen changes as follows: the total glycogen decreases abruptly in the liver, diminishes somewhat less in the m. abdominis (red muscle) and in the m.l.dorsi (white muscle) and exhibits small changes in the heart and in the lung, both in the newborn and in the adults. Examining the individual fractions, we find the following results: in the adult the trichloroacetic acid soluble fraction exhibits a great percentage decrease and there is an increase of the protein-bound glycogen; in the newborn, however, a similar decrease of the two fractions may be detected. Consequently there is no difference between the percentage distribution of the fractions in fasting and non-fasting newborn animals. In adults a shift occurs in the ratio of the two fractions.

Acute anoxia exerts the following effect on the tissue-glycogen of newborn rabbits: in the striated muscles it remains unchanged, in the liver a small but not significant variation occurs. In the lung, the simultaneous decrease of the two fractions causes a loss of 25%. In the heart-muscle 68% of the normal glycogen content disappears, which is the result of a break-down in both fractions, with relative increase of the protein-bound glycogen. MERRICK described a similar phenomenon in adults, with the exception that he found an increase in the absolute value of protein-bound glycogen as well.

In summary, higher glycogen values are found in the newborn in both fractions. The protein-bound glycogen of the newborn shows not such a degree of stability as in adults, which may be a result of the difference in the glycolytic processes.

Zs. N. GASPAR

Institute of Physiology, Veterinary Faculty, Budapest, October 2, 1956.

¹ A. W. MERRICK, Amer. J. Physiol. 176, 83 (1954). – A. W. MERRICK and D. K. MEYER, Amer. J. Physiol. 177, 441 (1954).