

Table II

Catalase activity of the liver and the kidney of normal guinea pigs and guinea pigs injected with yeast lecithin fraction

Exp. No.	Animal	Liver $\mu 1 O_2$	Kidney $\mu 1 O_2$
1	Normal	299	62
2	Normal	292	61
3	Treated	302	72
4	Treated	300	61

immediately removed, transferred in the cold room at 2°C and weighed. The homogenates (100 mg tissue in 10 ml 0.25 M sucrose) were prepared in a Potter-Elvehjem glass apparatus, and then centrifuged at 1500g for 10 min. The supernatant after this centrifugation was diluted 500 times with water. 2.6 ml of this solution were used for the determination of enzyme activity. In these experiments, perydrol (0.3 ml of a 1% solution) was placed in the side arm of the flask and mixed with the enzyme after 7 min necessary for temperature equilibration. As Table II shows, no decrease of liver or kidney catalase activity was recorded in these experiments. The mechanism of the inhibition of purified catalase by phospholipide extracts *in vitro* is difficult to understand, but it seems possible that a reaction with the iron bound to the enzyme molecule is involved, as in the case of cytochrome *c*. It is impossible, in the experimental conditions used in this paper, to think that the inhibition is due to the presence of free amino acids in phospholipide extracts, because free amino acids were not revealed in this material by paper chromatography.

L. MICHELAZZI

Department of General Pathology of the University of Genoa (Italy), July 9, 1957.

#### Riassunto

L'autore, analogamente a quanto ha già dimostrato avvenire per il citocromo *c*, mette in evidenza una potente azione inattivante la catalasi da parte dei fosfolipidi estratti da tessuti e dal lievito.

### Die Wirkung der Sulfationen auf das Membranpotential der isoliert durchströmten Säugetiermuskulatur

Isolierte Froschmuskel, in Natriumsulfatringer inkubiert, zeigen Erscheinungen (Fibrillationen, Nachkontraktionen bei direkter Reizung), die durch eine Herabsetzung der Kalziumionenkonzentration erklärt wurden (FREY<sup>1</sup>). Nach teilweisem Ersatz der Chlorid- durch Sulfationen in der Durchströmungsflüssigkeit isolierter hinterer Extremitäten von Katzen konnten wir jedoch kürzlich eine Reihe von Beobachtungen anstellen, die nicht allein mit einer dekalzifizierenden Wirkung der Sulfationen erklärt werden können; hierbei konnten wir zeigen, dass 1. unmittelbar nach der Umschaltung auf die sulfathaltige Durchströmungsflüssigkeit eine von der Höhe der Sulfatkonzentration abhängige zeitlich ziem-

lich konstante Steigerung der Kaliumfreisetzung aus der Muskulatur erfolgte (KRAUPP *et al.*<sup>2</sup>), 2. gleichzeitig damit eine mehrere Minuten andauernde reversible Kontraktur der Muskulatur auftrat (KRAUPP *et al.*<sup>2</sup>) und 3. während der Durchströmung mit sulfathaltiger Tyrodelösung eine dauernde beträchtliche Steigerung der Empfindlichkeit der Muskulatur gegenüber intraarteriell verabreichtem Acetylcholin (Kontrakturwirkung) in Erscheinung trat (STORMANN *et al.*<sup>3</sup>). An derselben Versuchsordnung rief Kalziumionenentzug allein die unter 1. angeführten Wirkungen nur in sehr geringem Ausmass, die in 3. angegebenen nur vorübergehend und die unter 2. erwähnte Kontrakturwirkung überhaupt nicht hervor (KRAUPP *et al.*<sup>4</sup>). Zum näheren Verständnis der Wirkung der Sulfationen auf die quergestreifte Muskulatur wurden in den nachstehend mitgeteilten Experimenten die bei Durchströmung mit Sulfationen ablaufenden elektrischen Veränderungen an den Membranen der Muskeln von hinteren Katzenextremitäten gleichzeitig mit den Kaliumverschiebungen untersucht.

**Methodik.** An isoliert durchströmten hinteren Extremitäten von Katzen (KRAUPP *et al.*<sup>4</sup>) wurde das Membranpotential des Musculus gracilis *in situ* mit Glasmikroelektroden (gefüllt mit 3M-KCl, 2–10 MΩ, Tippotential: unter 10 mV, ADRIAN<sup>5</sup>) intrazellulär registriert. Die Registrierung der Muskelspannung erfolgte am Musculus gastrocnemius mit Hilfe eines Dehnungsmeßstreifens und eines Sanborn Strain Gage Amplifiers sowie Direktschreibers (KRAUPP *et al.*<sup>4</sup>). Die Kaliumkonzentration wurde flammenphotometrisch und die Chloridkonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit nach der Methode von SCHALES und SCHALES<sup>6</sup> gemessen. Die Einstellung verschiedener Sulfatkonzentrationen erfolgte durch entsprechenden Ersatz des NaCl durch Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1. in der Durchströmungsflüssigkeit und 2. in der den Musculus gracilis bedeckenden Flüssigkeit (flüssigkeitsdichte Hauttasche am Oberschenkel) in der Weise, dass die Natriumkonzentration unverändert blieb und je zwei Mol Cl durch ein Mol SO<sub>4</sub> ersetzt wurden. Die Osmolarität wurde durch Zusatz von Saccharose aufrecht erhalten.

**Ergebnisse.** In 228 Einzelmessungen betrug der Mittelwert des Ruhepotentials bei normaler Durchströmung:  $-91,6 \pm 6,7$  mV (Standardabweichung). Nach Umschaltung auf chloridarme und sulfathaltige Durchströmungsflüssigkeiten trat gleichzeitig mit einem Ansteigen der venösen Kaliumkonzentration eine von der Höhe der Sulfatkonzentration bzw. Chloriderniedrigung abhängige Senkung des Ruhepotentials des Gracilismuskels in Erscheinung (Abb. 1). Die Sulfationenkonzentration betrug dabei in allen Versuchen den halben Wert der Chloridkonzentrationserniedrigung (siehe auch Methodik); alle anderen Ionenkonzentrationen wurden dabei konstant gehalten.

Die Messung des Ruhepotentials im Zeitpunkt der maximalen Depolarisation war schwierig durchzuführen, da die nach Einstich der Mikroelektroden gemessenen Potentialwerte zum Unterschied von dem Verhalten bei normaler Durchströmung nur kurze Zeit konstant blieben und immer wieder sprunghafte Änderungen auf etwas niedrigere oder höhere Potentialwerte zeigten.

<sup>2</sup> O. KRAUPP, B. PILLAT, H. STORMANN und P. H. CLODI, *Biochem. Z.* 329, 209 (1957).

<sup>3</sup> H. STORMANN, O. KRAUPP, B. PILLAT und P. H. CLODI, *Arch. exper. Path. Pharmacol.* 1957 (im Druck).

<sup>4</sup> O. KRAUPP, H. STORMANN, B. PILLAT und P. H. CLODI, *Arch. exper. Path. Pharmacol.* 229, 419 (1956).

<sup>5</sup> R. H. ADRIAN, *J. Physiol.* 133, 631 (1956).

<sup>6</sup> O. SCHALES und S. SCHALES, *J. biol. Chem.* 140, 879 (1941).

<sup>1</sup> E. FREY, *Arch. exper. Path. Pharmacol.* 98, 21 (1923).

Als Ursache dieser Instabilität des Membranpotentials konnten bei langsam ablaufender zeitlicher Registrierung des Membranpotentials am Oszillographen von Zeit zu Zeit spontan auftretende und mit einer Dämpfung ab-

ADRIAN bei Sulfatinkubation (unter 10 mM/l Kalium) beobachteten mechanischen Fibrillationen sein.

Bei der Erklärung des Wirkungsmechanismus der Sulfationen auf die Muskelmembran ist die Analogie zu

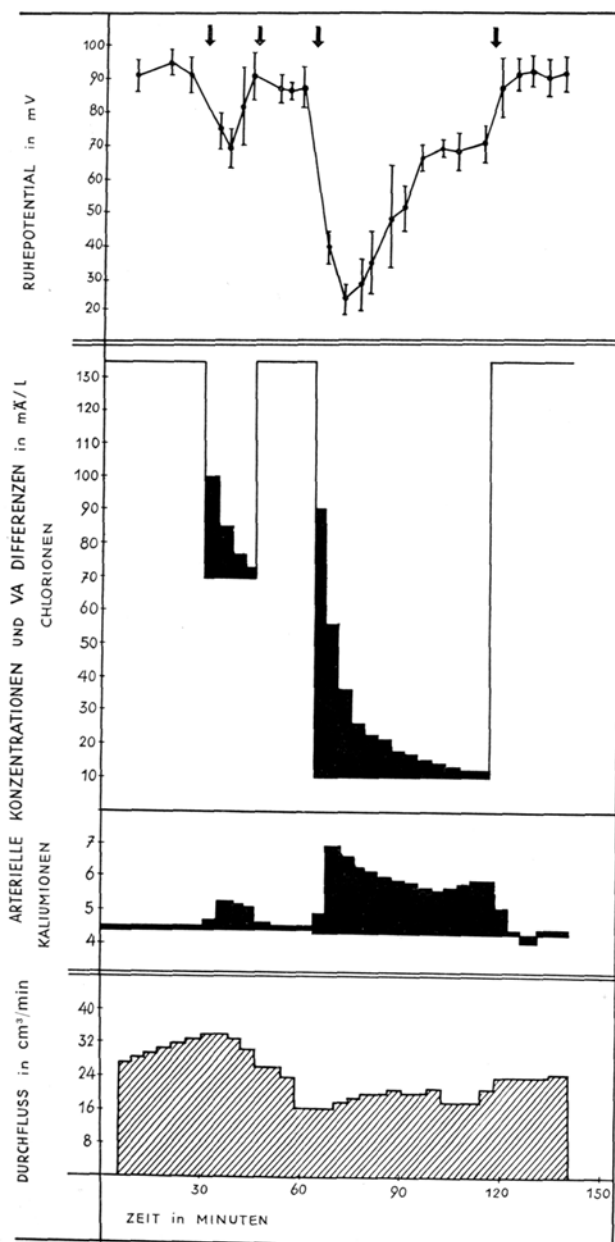


Abb. 1. Ruhepotential des *Musculus gracilis*, veno-arterielle Konzentrationsdifferenzen für Chlor- und Kaliumionen sowie Durchströmungsvolumen einer isoliert durchströmten hinteren Katzenextremität. Die Pfeile am oberen Rand der Abbildung zeigen die Zeitpunkte der Chloridkonzentrationsänderungen an. Die arterielle Sulfatkonzentration betrug zwischen 1. und 2. Pfeil: 32 mM/l und zwischen 3. und 4. Pfeil 62,5 mM/l. Die senkrechten Balken in Kurve I geben die Standarddeviation der einzelnen Meßserien. In Kurve II und III, äusserer Kurvenzug: arterielle bzw. Badkonzentrationen. Ausgefüllte Felder: VA Konzentrationsdifferenzen.

laufende Aktionspotentialsalven nachgewiesen werden, wobei gelegentlich auch eine Umkehr des Membranpotentials zu beobachten war (Abb. 2). Diese rhythmischen Entladungen dürften die Ursache für die von

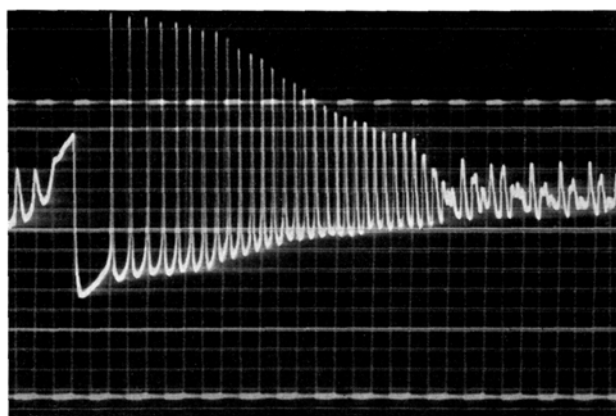


Abb. 2. Oszillationen des Membranpotentials des *Musculus gracilis* einer isolierten hinteren Katzenextremität bei Durchströmung mit 65 mM/l  $\text{SO}_4^{2-}$ , 15 mM/l  $\text{Cl}^-$ , 10 mM/l  $\text{HCO}_3^-$ , 149 mM/l  $\text{Na}^+$ , 4,2 mM/l  $\text{K}^+$  und 1,8 mM/l  $\text{Ca}^{++}$ . Intrazelluläre Registrierung; Zeitkonstante des Verstärkers: 65  $\mu\text{s}$  bei 5  $\text{M}\Omega$  Elektrodenwiderstand; Zeitmarkierung: 50/s; Ordinate: Obere strichlierte Linie: 0 mV, untere strichlierte Linie: -100 mV.

den Wirkungen des Veratrin (Depolarisation, Kaliumfreisetzung, Kontraktur und Instabilitäterscheinungen der depolarisierten Membran) (STRAUB<sup>7</sup>, KUFFLER<sup>8</sup>, ERNST<sup>9</sup>) auffallend. Es ist daher naheliegend, auch bei der Sulfatwirkung eine Erhöhung der Natriumpermeabilität als eine der Ursachen für das Zustandekommen der beobachteten Erscheinungen anzunehmen. Zusätzlich kann jedoch eine durch Erniedrigung der extrazellulären Chloridkonzentration hervorgerufene Störung eines an der Muskelmembran bestehenden Donnan-gleichgewichtes nicht ausgeschlossen werden (BOYLE und CONWAY<sup>10</sup>, KRAUPP *et al.*<sup>2</sup>). Die beobachteten Wirkungen des Sulfations weisen freilich auch starke Parallelen zur Wirkung des Kalziumentzugs auf (BRINK<sup>11</sup>). Dies gilt vor allem für die Membranstabilität und die damit verbundenen repetitiven schwingungsförmigen Aktionsstromabläufe. Ausmass und Verlauf der starken Membrandepolarisation, Auftreten der Kontraktur sowie die sprunghafte Erhöhung der Kaliumfreisetzung sprechen jedoch gegen einen ausschliesslich auf Herabsetzung der Kalziumionenkonzentration beruhenden Wirkungsmechanismus der Sulfationen, zumal unter den von uns verwendeten  $\text{SO}_4$ -Konzentrationen (rund  $5 \cdot 10^{-2}$  M/l) keine besonders starke Herabsetzung der Kalziumkonzentration zu erwarten ist. (Oberer Grenzwert der extrazellulären Konzentration bei etwa 1,6 mM/l Ca bei Annahme eines Löslichkeitsproduktes von  $8 \cdot 10^{-5}$  für  $\text{CaSO}_4$  bei 36°C.)

G. GIEBISCH, O. KRAUPP, B. PILLAT und H. STORMANN

Pharmakologisches Institut der Universität Wien, 3. Juni 1957.

<sup>7</sup> R. W. STRAUB, *Helv. physiol. Acta* 14, 1 (1956).

<sup>8</sup> S. W. KUFFLER, *J. Neurophysiol.* 9, 367 (1946).

<sup>9</sup> E. ERNST, 10. Tagung der ungarischen physiologischen Gesellschaft, Rona 121, 666 (1940).

<sup>10</sup> P. J. BOYLE und E. J. CONWAY, *J. Physiol.* 100, 1 (1941).

<sup>11</sup> F. BRINK, *Pharmacol. Rev.* 6, 243 (1954).

Summary

Electrical potential measurements of membrane resting and action potentials were made by means of electrolyte-filled glass micro-electrodes on single fibres of the musculus gracilis of the cat using a perfused hind-limb preparation *in situ*. The release of potassium from muscle and the tension developed by the gastrocnemius muscle were simultaneously recorded. The normal resting potential in our series was 91.7 mV (s.d.  $\pm$  6.7 mV). Partial replacement of the chloride by sulfate in the perfusion fluid led to (a) potassium release from the perfused hind-limb, (b) reversible contracture of the gastrocnemius muscle, (c) depression of the membrane resting potential which was proportional to the degree of replacement of chloride by sulfate in the perfusion fluid and (d) to the occurrence of volleys of spontaneous fibrillation potentials some of which had the shape of damped oscillations. These findings are similar to those observed after treatment with veratrine and are interpreted to be due to (1) increase in sodium permeability and (2) disturbance of the Donnan equilibrium for chloride ions.

Über die Wirkung blutzuckersenkender Sulfonylharnstoffe auf das isolierte Rattenzwerchfell

Der Wirkungsmechanismus der blutzuckersenkenden Sulfonylharnstoffe ist nicht geklärt. Besonders über die Wirkung dieser Substanzen auf den Kohlehydratstoffwechsel des Muskels bestehen relativ wenige Untersuchungen. Am isolierten Zwerchfell verursachen Sulfonylharnstoffe je nach den Autoren Verminderung<sup>1</sup> oder Vermehrung<sup>2</sup> der Glukoseaufnahme aus dem Inkuba-

tionsmedium; die Glykogenbildung ändert sich nicht<sup>3</sup>. Über Einfluss der Sulfonylharnstoffe auf O<sub>2</sub>-Verbrauch und CO<sub>2</sub>-Bildung durch das isolierte Zwerchfell wurde unseres Wissens bisher nicht berichtet.  
In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Tolbutamid<sup>4</sup> und Carbutamid<sup>4</sup> auf das isolierte Rattenzwerchfell untersucht. Durch Vergleich dieser Substanzen mit Insulin sollten weitere Anhaltspunkte über den Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe erhalten werden.

**Methodik.** Männliche Albinoratten von 60 bis 80 g wurden nach 24stündigem Fasten dekapitiert. Das exzidierte Zwerchfell wurde zweimal in eisgekühltem O<sub>2</sub>-gesättigtem Phosphatpuffer (siehe unten) gewaschen, sagittal halbiert, zwischen Filtrierpapier getrocknet und gewogen. Zeitdauer zwischen Dekapitation und Waschung 1 min 10 s  $\pm$  10 s, Aufenthalt in den Waschflüssigkeiten durchschnittlich 3 min, Zeit für Trocknen und Wägen 10 s  $\pm$  3 s. Die Inkubation erfolgte in O<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37,5°C in Phosphatpuffer<sup>5</sup> (ohne Kalzium, Glukosekonzentration 220 mg%), Schüttelfrequenz 150/min. In Doppelansätzen (Kontrolle und Versuch) wurden Zwerchfelhälfen derselben Tiere verglichen. Tolbutamid und Carbutamid wurden in 0,05 ml 1*N* KOH, Insulin<sup>6</sup> in 0,05 ml 0,01*N* HCl gelöst und dem Inkubationsmedium zugesetzt. Korrektur des pH mittels HCl, bzw. NaOH.

Die Bestimmung des Glukoseverbrauches erfolgte aus der Glukosedifferenz<sup>7</sup> der Inkubationsflüssigkeit vor und nach 30minütiger Inkubation einer Zwerchfelhälfte in

<sup>1</sup> D. W. CLARKE, M. DAVIDSON, E. SCHÖNBAUM und H. SENMAN, Canad. med. Ass. J. 74, 966 (1956).

<sup>2</sup> N. CANAL, S. GARATTINI und L. TESSARI, Clin. terap. 11, 472 (1956).

<sup>3</sup> D. W. CLARKE, M. DAVIDSON, E. SCHÖNBAUM und H. SENMAN, Canad. med. Ass. J. 74, 966 (1956). – J. B. FIELD und M. L. WOODSON, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N. Y. 93, 534 (1956). – C. v. HOLT, Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 62, 520 (1956).

<sup>4</sup> Tolbutamid = 1-*p*-Tolylsulfonyl-3,*n*-butylharnstoff; Carbutamid = 1-*p*-Sulfanilyl-3,*n*-butylharnstoff.

<sup>5</sup> H. A. KREBS und K. HENSELEIT, Hoppe-Seylers Z. 210, 32 (1932).

<sup>6</sup> Kristallisiertes Insulin 'Novo'.

<sup>7</sup> H. C. HAGEDORN und B. N. JENSEN, Biochem. Z. 135, 46 (1923); 137, 92 (1923).

Tabelle I

Vergleich von Glukoseverbrauch, bzw. Glykogengehalt von Zwerchfelhälfen gleicher Tiere mit und ohne Zusatz von Insulin, Tolbutamid oder Carbutamid.  
Zwerchfelhälfen wurden parallel mit und ohne Zusatz inkubiert. Die Absolutwerte der Ansätze mit Präparat wurden auf Absolutwerte der Ansätze ohne Präparat bezogen und die Änderung in Prozent angegeben. (Durchschnittlicher absoluter Glukoseverbrauch von Kontroll-Zwerchfelhälfen: 5,63 mg/g Feuchtgewicht und Stunde. Glykogengehalt der Kontroll-Zwerchfelhälfen durchschnittlich 267 mg/100 g Feuchtgewicht.)

Zusatz zum Inkubationsmedium	Veränderung des Glukoseverbrauches in %			Veränderung der Glykogenkonzentration in %		
	N	Mittelwert und <i>m</i> *	<i>p</i> **	N	Mittelwert und <i>m</i> *	<i>p</i> **
Schwankungsbreite der Methode ( <i>K</i> ) . . . . .	10	– 6,2 $\pm$ 2,5		9	– 0,3 $\pm$ 2,4	
Insulin 1 E/ml . . . . .	17	+ 86,9 $\pm$ 17,7	< 0,001	17	+ 22,1 $\pm$ 5,6	< 0,02; > 0,01
0,1 E/ml . . . . .	12	+ 49,7 $\pm$ 9,9	< 0,001			
Tolbutamid 2 · 10 <sup>–3</sup> mol/l . . . . .	8	+ 66,3 $\pm$ 18,8	< 0,001	12	– 22,1 $\pm$ 4,6	< 0,001
2 · 10 <sup>–4</sup> mol/l . . . . .	11	+ 31,5 $\pm$ 11,4	< 0,01; > 0,001			
2 · 10 <sup>–5</sup> mol/l . . . . .	7	+ 20,5 $\pm$ 12,6	< 0,03; > 0,02			
Carbutamid 2 · 10 <sup>–3</sup> mol/l . . . . .	9	+ 46,2 $\pm$ 12,6	< 0,001			
2 · 10 <sup>–4</sup> mol/l . . . . .	16	+ 27,9 $\pm$ 7,9	< 0,01; > 0,001			

\* Mittlerer Fehler  $m = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{N(N-1)}}$ .

\*\* Bezogen auf Kontrollserie für Schwankungsbreite (*K*).