

Enzymic Oxidation of Aminoketones in Mammalian Blood Plasma

Whereas much is known of the biological significance of the intracellular amine oxidases that of the soluble amine oxidases of mammalian blood plasma is still unknown¹.

The first of the plasma enzymes to be discovered was the bovine spermine oxidase². In 1960, ELLIOTT³ reported that bovine plasma also oxidized aminoacetone, with the formation of methylglyoxal and ammonia. His suggestion, that the spermine oxidase was the catalyst of this reaction, finds support in our recent observations. A preparation of the bovine oxidase, purified as far as step 5 according to the procedure recently described by YAMADA and YASUNOBU⁴, was fully active on aminoacetone. We have found that this preparation acted also on δ -amino-laevulinic acid, but at a rate much less than with aminoacetone. It seems likely, therefore, that both aminoketones are substrates of spermine oxidase.

We have examined sera from a number of mammalian species known to contain an amine oxidase in order to find out if aminoacetone is oxidized. The serum of two other ruminants, the sheep and the goat, also acted on aminoacetone. However, the serum of *Procapra capensis*, a member of the order Hyracoidea, readily acted on spermine but was without action on aminoacetone. Thus, the ability to act on aminoacetone is not a property common to all animals that contain a spermine oxidase.

An enzyme that has been described as benzylamine oxidase occurs in the blood plasma of the horse, the pig and many other non-ruminants. In horse serum aminoacetone was found to be oxidized. In the pig, where a partial purification of the plasma oxidase has been achieved, neither aminoacetone nor δ -aminolaevulinic acid were oxidized at significant rates.

These observations are of interest in connection with the biological significance of the plasma enzymes. Oxi-

dases able to act on aminoacetone can be shown to be present in the plasma of a number of species, but not all animals in which a plasma oxidase has been found have this activity. The line of division between species with spermine oxidase and those with benzylamine oxidase does not coincide with the line of separation between animals able to act on aminoketones and those unable to do so⁵⁻⁷.

Zusammenfassung. Rinderserum oxydert Aminoaceton rasch und δ -Aminolävulinsäure langsam, Reaktionen, die wahrscheinlich von der Sperminoxydase katalysiert werden. Aminoketone werden jedoch nicht im Plasma aller Tierarten oxydiert, welche Spermin oxydieren. Plasma von Tierarten, in denen Benzylaminoxydase vorkommt, oxydieren in der Regel ebenfalls Aminoaceton. Eine Ausnahme: Die Benzylaminoxydase des Schweines greift die beiden Aminoketone nicht merklich an.

FRANCA BUFFONI and H. BLASCHKO

Department of Pharmacology, University of Oxford (England), April 16, 1963.

- 1 H. BLASCHKO, Adv. comp. Physiol. Biochem. 1, 67 (1962).
- 2 J. G. HIRSCH, J. exp. Med. 97, 345 (1953).
- 3 W. H. ELLIOTT, Nature, Lond. 185, 467 (1960).
- 4 H. YAMADA and K. T. YASUNOBU, J. biol. Chem. 237, 1511 (1962).
- 5 We are grateful to Dr. D. B. HOPE for the aminoacetone and to Professor A. NEUBERGER, F.R.S., for the δ -aminolaevulinic acid used in these experiments.
- 6 This work has been supported by a grant from the European Office, U.S. Office of Aerospace Research.
- 7 Dedicated to Professor A. VON MURALT on the occasion of his 60th birthday.

Beeinflussung der experimentellen allergischen Encephalomyelitis durch ϵ -Aminocapronsäure

Immunologische Reaktionen vom Tuberkulintypus (delayed reaction) können durch vorgängige oder gleichzeitige Gabe verschiedener Substanzen im Tierversuch abgeschwächt werden. Bei der experimentellen allergischen Encephalomyelitis (EAE), welche hauptsächlich seit den Arbeiten von WAKSMAN^{1,2} ebenfalls als verzögerte Immunreaktion aufgefasst wird, lassen ACTH und Corticosteroide, wie auch cytotoxische Substanzen eine hemmende Wirkung erkennen³⁻⁸.

Von der ϵ -Aminocapronsäure (ϵ -ACS) ist bekannt, dass sie verzögerte Immunreaktionen wirksam hemmen kann. Dies wurde bisher am Beispiel der Tuberkulinreaktion selbst⁹ und der Intoleranz gegen Homotransplantate¹⁰ gezeigt. Die genaue Wirkungsweise der Substanz ist gegenwärtig noch nicht bekannt¹¹⁻²⁰.

In Fortführung früherer Untersuchungen schien uns von Interesse, das Verhalten der EAE unter dem Einfluss von ϵ -ACS zu verfolgen.

Methodisches. Bei drei Serien von je 10 stammgleichen Kaninchen wurde homologes Rückenmarksgewebe gemischt mit Freundschem Adjuvans (Difco) im Verhältnis 1:2 einzeitig in alle 4 Pfoten und an einer Stelle der Rückenhaut intrakutan injiziert. Die injizierte Menge betrug total 0,5 ml für jedes Tier, entsprechend ca. 150

- 1 B. H. WAKSMAN und L. R. MORRISON, J. Immunol. 66, 421 (1951).
- 2 B. H. WAKSMAN, Medicine 41, 93 (1962).
- 3 A. FERRARO und L. RORIZIN, J. Neuropath. exp. Neurol. 12, 373 (1953).
- 4 E. J. FIELD und H. MILLER, Arch. int. Pharmacodyn. 134, 76 (1961).
- 5 L. W. HOYER, R. M. CONDIE und R. A. GOOD, Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.) 103, 205 (1960).
- 6 E. A. KABAT, A. WOLF und A. E. BEZER, J. Immunol. 68, 265 (1952).
- 7 S. LEVINE, R. STREBEL, E. J. WENK und P. J. HARMAN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.) 109, 294 (1962).
- 8 J. D. THOMSON und R. W. AUSTIN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.) 111, 121 (1962).
- 9 G. ITOGA und T. YOGO, Keio J. Med. 8, 299 (1959).
- 10 A. BERTELLI und G. FRONTINO, Nature (London) 197, 510 (1963).
- 11 W. A. ATCHLEY und N. V. BITAGAVAN, Science 138, 528 (1962).
- 12 P. LEFÈBURE, J. SALMON, J. LECOMTE und H. VON CAUWENBERGHE, C. R. Soc. Biol. (Paris) 156, 183 (1962).
- 13 I. MIKATA, M. HASEGAWA, T. IGARASHI, N. SHIRAKURY, M. HOSHIDA und K. TOYAMA, Keio J. Med. 8, 319 (1959).
- 14 J. M. NILSSON, A. SJOERDSMA und J. WALDENSTROM, Lanceet I, 1322 (1960).
- 15 W. OSWALD Z. ges. inn. Med. 17, 301 (1962).
- 16 G. RITZEL und R. WÜTHRICH, in Vorbereitung.
- 17 F. ROTH, Ther. Umsch. 19, 358 (1962).
- 18 A. STACHER, Wien. med. Wschr. 74, 771 (1962).
- 19 K. THOMAS, K. STALDER und H. STEGEMANN, Hoppe-Seylers Z. 317, 276 (1959).
- 20 K. YOKOYAMA und H. HATANO, Keio J. Med. 8, 303 (1959).

mg Rückenmarksgewebe. Frühere ausgedehnte Versuche ²¹⁻²² hatten gezeigt, dass mit dieser Methode bei 80 % der sensibilisierten Tiere eine EAE auftritt.

Die erste Serie von 10 Tieren wurde als «Kontrolle» verwendet: Vom Tage der Sensibilisierung an wurden während 14 Tagen täglich 2,5 ml/kg physiologische NaCl-Lösung intravenös injiziert. Die Tiere der zweiten Serie erhielten ebenfalls täglich während 14 Tagen nach erfolgter Antigeninjektion 250 mg ϵ -ACS jeweils in einer Dosis, die Tiere der dritten Serie 500 mg ϵ -ACS in 2 Dosen (vormittags und abends) injiziert. Die klinisch an EAE erkrankten Tiere wurden innerhalb von 24 h durch Entbluten getötet. Bei allen Serien wurde der Versuch 4 Wochen nach der Sensibilisierung durch Tötung der verbleibenden Tiere abgeschlossen. Kurz vorher erfolgte bei allen Tieren eine Suboccipitalpunktion.

Histologisch kamen von jedem Tier das Grosshirn, der Hirnstamm, das Cervicalmark und das Lumbalmark zur Untersuchung. Die Intensität der histologischen Veränderungen wurde durch einen Index (Tabelle I, Kol. 3) ausgedrückt (Summe der von 0-3 bewerteten zellulären Infiltration der Meningen, des Parenchys und der Gefässadventitia aller 4 untersuchten Stellen des Nervensystems).

Das Milzgewicht wurde bei allen Tieren unmittelbar nach der Obduktion bestimmt.

Für die serologischen Untersuchungen entnahmen wir Blutproben vor der Sensibilisierung, am 10. und ca. 20. Tage danach, sowie bei der Entblutung. Jeweils zum gleichen Zeitpunkt wurde die granulomatöse Lokalreaktion an der Injektionsstelle des Antigens kontrolliert und nach ihrer Intensität von 0-3 beurteilt (Wertung gesondert für Vorderpfoten, Hinterpfoten und Rückenhaut; Summe der drei Bewertungen s. Index: Tabelle I, Kol. 4). Der serologische Nachweis von Antikörpern gegen homologes nervöses Gewebe geschah im Doppeldiffusionsverfahren nach OUCHTERLONY auf der Agarplatte ^{21,23}.

Ergebnisse. Aus Tabelle I geht hervor, dass bei den «Kontrolltieren» 9 von 10 pathologisch-anatomische Krankheitszeichen hatten, während klinisch 7 Tiere typische neurologische Symptome der EAE zeigten. Die einmal täglich mit 250 mg ϵ -ACS behandelten Tiere wiesen eine praktisch gleiche Inzidenz krankhafter Erscheinungen auf (9 von 10, bzw. 8 von 10). Die mit 500 mg ϵ -ACS jeweils behandelten Kaninchen zeigten demgegenüber einen erheblich geringeren Krankheitsbefall (2 von 10, bzw. 4 von 10).

Tabelle I. Zusammenstellung der Befunde bei 30 mit homologem Rückenmarksgewebe sensibilisierten Kaninchen (Erklärungen vgl. Text)

Versuchsserie	1	2	3	4	5
	Klinisch krank	Path.- anat.	Histo- pathol. EAE- Befund	Pfoten- schwell- lung (Mittel aller Tiere)	Milz- gewichte
I 10 Tiere (NaCl physiol.)	7	9	11,2	2,9	1,1 g
II 10 Tiere (0,25 g ϵ -AC/die)	8	9	11,7	2,5	1,4 g
III 10 Tiere (0,5 g ϵ -AC/die)	2	4	3,5	1,6	1,3 g

Die übrigen beurteilten Parameter erwiesen sich bei der «Kontrollgruppe» und der mit niedrigen ϵ -ACS-Dosen behandelten Gruppe als wenig different. Hingegen zeigten die zweimal täglich mit total 500 mg behandelten Tiere auch hier Verschiedenheiten gegenüber den «Kontrollen». Die wenigen erkrankten Tiere dieser Gruppe liessen bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung auch einen wesentlich geringeren Befund nachweisen. Ihre Liquoreiweißwerte waren dementsprechend nur wenig erhöht. (Durchschnitt bei den 4 Tieren mit pathologisch-anatomischem EAE-Befund: 70 mg% gegenüber: 140 mg% bei den entsprechenden unbehandelten Tieren.)

Von Interesse scheint uns der Lokalfund am Injektionsort zu sein: Am zehnten Tag nach der sensibilisierenden Injektion waren bei den «Kontrolltieren» und denjenigen der Versuchsgruppe 1 schon deutliche granulomatöse Reaktionen vorhanden; bei den Tieren der Versuchsgruppe 2 war diese Reaktion vergleichsweise viel geringer. Nach Absetzen der ϵ -ACS-Behandlung glichen sich die Unterschiede weitgehend aus.

Die Milzgewichte liessen keine signifikanten Differenzen erkennen. Die serologischen Befunde sind in Tabelle II zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass nach Ablauf der ersten 3 Versuchswochen in der «Kontrollgruppe» bei 9 von 10 Tieren Antikörper nachweisbar waren. Demgegenüber war bei Gruppe 1 der behandelten Tiere in 7 von 9 Fällen, bei Gruppe 2 in 6 von 10 Fällen der Antikörernachweis positiv.

Tabelle II. Serologische Befunde bei 29 mit homologem Rückenmarksgewebe sensibilisierten Kaninchen mit und ohne Zusatz von ϵ -Amino-capronsäure

Versuchsserie	Positiver Antikörernachweis (Anzahl Tiere)	Vor Sensibili- sierung		Nach Sensibilisierung	
		10 Tage	20 Tage	10 Tage	20 Tage
I 10 Tiere (NaCl physiol.)	0	5	9		
II 9 Tiere (0,25 g ϵ -AC/die)	0	2	7		
III 10 Tiere (0,5 g ϵ -AC/die)	0	4	6		

Zwei ausschließlich mit ϵ -ACS behandelte Tiere blieben klinisch gesund und wiesen keine pathologischen Veränderungen im Zentralnervensystem und im Bereich anderer Organe auf. In Tabelle III sind die Resultate der nach

Tabelle III. Zusammenstellung der Signifikanzberechnungen (gemäss Ergebnissen der Tabellen I und II)

Kriterien	Vergleich (Serie)	Signifikanz*
1. Klinisch krank	III vs. I	$X^2 = 3,23$ ($P = 0,07$)
2. Path.-anat. EAE	III vs. I	$X^2 = 3,52$ ($P = 0,06$)
3. Histopath. Index	III vs. I	$t = 2,88$ ($P = 0,01$)
4. Pfotenschwellung	III vs. I	$t = 2,04$ ($P = 0,06$)
5. Antikörper nach 20 Tagen	III vs. I	$X^2 = 1,06$ ($P > 0,10$)

* Alle X^2 : unter Anwendung der Yatesschen Korrektur berechnet.

²¹ R. WÜTHRICH, G. RITZEL, H. P. RIEDER und C. G. HONEGGER, Med. exp. (Basel) 7, 344 (1962).

²² R. WÜTHRICH, in Vorbereitung.

²³ H. P. RIEDER, G. RITZEL und R. WÜTHRICH, Z. Immun. Forsch., im Druck (1963).

dem X²-Test erfolgten statistischen Berechnungen hinsichtlich der einzelnen beurteilten Kriterien zusammengestellt.

Diskussion. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die EAE durch ϵ -ACS wirksam gehemmt wird, wobei eine Abhängigkeit von der applizierten Dosis zu bestehen scheint. Die wirksame Dosierung liegt an der oberen Grenze der vom Kaninchen parenteral tolerierten¹⁹. Dabei dürfte auch der Häufigkeit der Zufuhr eine Bedeutung zukommen, da NILSSON et al. die rasche Elimination des Wirkstoffes nach intravenöser Gabe nachgewiesen haben¹⁴.

Weniger eindeutig gibt sich eine unter ϵ -ACS reduzierte Antikörpersynthese zu erkennen. Immerhin weisen die in Tabelle II enthaltenen Daten in diese Richtung. Demgegenüber war die Beeinflussung der granulomatösen Reaktion am Injektionsort des Antigens eindrücklich. Das unterschiedliche Verhalten der beiden letztgenannten Parameter weist auf die besondere Bedeutung der zellständigen Immunität bei der EAE hin. Eine ähnliche Wirkung auf die Granulationsbildung wird auch bei Verwendung von Nebennierenrinden-wirksamen Stoffen immer wieder beschrieben⁴. Es liegt deswegen nahe, die Hemmwirkung der ϵ -ACS bei verzögter Immunreaktion

mit dem antiphlogistischen Effekt der Corticosteroide in Parallele zu setzen. Darüber hinaus lässt sich eine Beeinträchtigung der Proteinsynthese durch die stoffwechselremde Aminosäure denken¹⁶.

Der durch unsere Untersuchungen am Beispiel der EAE erneut erbrachte Nachweis einer Hemmwirkung auf die verzögerte Immunreaktion bei weitgehender Atoxizität¹⁸ legt den Gedanken an eine klinische Verwendung dieser Substanz bei hyperergischen Zuständen auch im Bereich des Zentralnervensystems nahe.

Summary. The effect of ϵ -aminocaproic acid on EAE of rabbits was investigated. A partial inhibition, dependent on the dose administered by intravenous injection, can be proved. The formation of antibodies is not significantly impaired, whereas an inhibition of local granulomatosis is obvious. The results obtained can be interpreted as an inhibition of delayed immune reaction.

R. WÜTHRICH, H. P. RIEDER und G. RITZEL

Neurologische Klinik der Universität Basel und Schularztamt Basel (Schweiz), 29. Mai 1963.

Increased Inactivation of Polysaccharide Phosphorylase in Liver Homogenates from Rats Treated with 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine¹

It has long been known that treatment with large doses of thyroid hormone leads to depletion of glycogen and ATP from the liver²⁻⁶. Loss of liver glycogen is often accompanied by an increase in PPh activity. Nevertheless rat liver PPh activity is significantly decreased after administration of several doses of T-3⁷.

Since active Phosphorylase *a* requires ATP for its formation from inactive Phosphorylase *b*⁸⁻¹⁰, it was thought that a lowering of ATP could result in a failure of the active enzyme to be maintained at its normal level. However, previous experiments in this laboratory have failed to reveal a significant difference between the ability of liver homogenates from normal and T-3 treated rats to activate inactive Phosphorylase *b*.

The decrease in liver PPh activity following T-3 administration may be the result of (1) an actual increase in IE activity (which transforms Phosphorylase *a* into *b*), or (2) a greater proteolytic breakdown of the enzyme. Both of these possibilities have been investigated in the present study.

Methods. Thirty-six male albino rats fed *ad libitum* and weighing 180–230 g were used. They were distributed into 3 groups of 12 rats each (6 T-3 treated and 6 controls). T-3 in a mild alkaline solution was administered intraperitoneally in doses ranging from 500 µg/kg body weight (1st group) to 100 µg/kg (2nd group) and 50 µg/kg (3rd group). The injections were given daily for three consecutive days. Control rats received daily injections of the vehicle (5 ml/kg). The animals had access to food and water to within 8 h of the time of sacrifice.

24 h after the last injection, the rats were killed by decapitation. Following rapid removal, the liver was homogenized with cold 0.9% KCl solution in a Potter all-glass homogenizer to give a concentration of 100 mg wet tissue per ml. PPh activity was assayed according to SUTHER-

LAND and WOSILAIT¹¹. The results are expressed as mg of Pi produced from Glucose-1-phosphate per g wet tissue in 8 min at 37°C. Pi was determined by the method of BRIGGS and ZAMBOTTI¹²⁻¹³. IE activity was estimated by measuring the decrease in PPh activity which occurred when liver homogenates were incubated with an equal volume of 0.02 M Tris buffer (pH 7.4) at 37°C for 4 min. 'Proteolitic' inactivation was determined by the fall in PPh activity which occurred when liver homogenates were incubated at 37°C for 10 min with an equal volume of 0.02 M Tris buffer (pH 7.4) containing 0.2 M KF, which at this concentration almost completely inhibits IE.

¹ Dedicated to Prof. A. v. MURALT on the occasion of his 60th birthday. – The following abbreviations are used: ATP, adenosine triphosphate; PPh, polysaccharide phosphorylase; IE, inactivating enzyme or phosphorylase phosphatase; Tris, Tris (hydroxymethyl) aminomethane; Pi, inorganic phosphate; T-3, 3,5,3'-triiodo-L-thyronine.

² M. PARHON, J. Physiol. Path. gén. 15, 75 (1913).

³ I. A. MIRSKI and R. H. BROH-KHAN, Amer. J. Physiol. 117, 7 (1936).

⁴ K. FLETCHER and N. B. MYANT, Endocrinology 71, 870 (1962).

⁵ O. P. CHILSON and J. SACKS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 101, 331 (1959).

⁶ F. CHATAGNER and D. GAUTHERON, Biochim. biophys. Acta 41, 544 (1960).

⁷ V. MARTINI, M. ORUNESU, and E. FUGASSA, Boll. Soc. Ital. Biol. sper., in press.

⁸ W. D. WOSILAIT and E. W. SUTHERLAND, J. biol. Chem. 218, 459 (1956).

⁹ W. D. WOSILAIT and E. W. SUTHERLAND, J. biol. Chem. 218, 469 (1956).

¹⁰ W. D. WOSILAIT and E. W. SUTHERLAND, J. biol. Chem. 218, 483 (1956).

¹¹ E. W. SUTHERLAND, *Methods in Enzymology* (Academic Press, 1955), vol. I, p. 215.

¹² A. P. BRIGGS, J. biol. Chem. 53, 13 (1922).

¹³ V. ZAMBOTTI, Microchemie 26, 113 (1939).