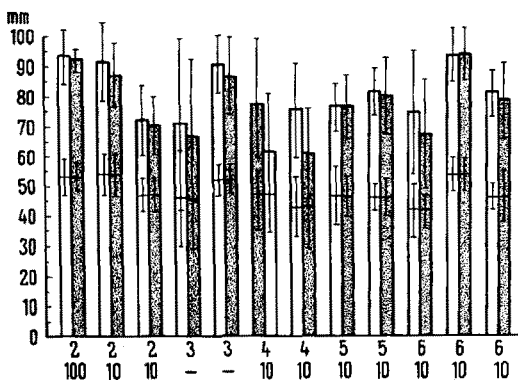
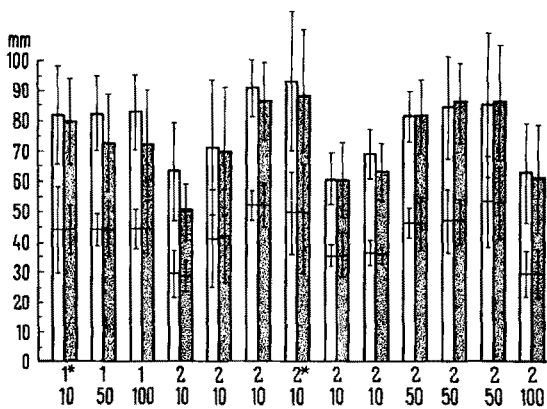


Die durch animalische Mucoproteine verursachte Wachstumshemmung

In den letzten Jahren wurde ein umfangreiches Tatsachenmaterial über die biologische Bedeutung der Mucoproteine im menschlichen Organismus gesammelt. Es ergibt sich, dass eine antienzymatische Wirkung eine Hauptrolle zu spielen scheint. Von einigen Autoren^{1,2} wurde die Trypsininhibition mit Hilfe des Ovomucoids bestätigt, z.B. aus dem Eiereiweiss der Ente, oder mit Mucoproteinfraktionen C-2 und C-3 nach GOA³. Vom klinischen Standpunkt aus ist wichtig, dass die sogenannte Mucoprotease des Magensaftes die Pepsinaktivität sehr stark hemmt, öfters bis zum Nullwert⁴. Auch die Katalasehemmung wurde nachgewiesen: ABRIGNANI und MUTOLO^{5,6} fanden, dass das Ovomucoid nach dem Kochen – oder das Filtrat der Eiweisslösung von Eiern nach dem Erhitzen – auf die Katalase stark hemmend wirkt, obwohl das im Wasser gelöste reine Ovomucoid vollkommen inaktiv erscheint. Auch die heparinoide, antikoagulative Wirkung der Mucoproteine⁷ und der Hirnganglioside⁸ *in vitro* kann wahrscheinlich durch einen Einfluss auf Blutenzyme erklärt werden. Dasselbe scheint für die Beeinflussung der Leukocytenmigration zu gelten^{9,10}.



Längen der keimenden Samen von *Lupinus albus* bei Kontrollgruppen (leere Säulen) und bei Testen (schraffiert). Obere Querlinie = nach dem Versuch, untere = vor dem Versuch. Abszissen = Standarddeviationswerte. Unter den Säulen steht die Nummer des Präparats (entspricht der Bezeichnung in der Tabelle), und die benutzte Konzentration in mg%. Bei den mit * bezeichneten Versuchen betreffen Kontrolle wie Test je 16 Samen, in allen übrigen Versuchen je 8 Samen.

Die gefundenen Tatsachen lassen an eine Wirkung der Mucoproteine auf das Gesamtwachstum eines tierischen sowie pflanzlichen Organismus denken. Wir prüften deshalb die Wirkung verschiedener animalischer Mucoproteine auf die Keimung der Samen von *Lupinus albus* L., Hadmersleben¹¹, sowie auch auf Wachstum und Metamorphose der Kaulquappen von *Rana temporaria*.

Als Test wurde benutzt: (a) Mucoprotein des menschlichen Plasmas, isoliert nach WEIMER et al.¹², in Konzentrationen 10, 50 und 100 mg% in 0,9prozentiger Kochsalzlösung, das vor dem Benutzen speziell durch komplette Dialyse gegen destilliertes Wasser gereinigt wurde; (b) Mucoprotein des menschlichen Plasmas, isoliert nach derselben Methode und in denselben Konzentrationen, aber im ursprünglichen Zustand; (c) Mucoprotein des Rinderplasmas¹³ (isoliert nach derselben Methode); (d) Mucoprotein des menschlichen Plasmas, das kurz vorher zum Sieden gebracht wurde (vgl. die obenerwähnten Befunde über die Antikatalasewirkung des Ovomucoids nach der Änderung der molekularen Konfiguration durch das Erhitzen); (e) Mucoproteine des menschlichen Harns (isoliert nach ANDERSON und MACLAGAN¹⁴); (f) zur Kontrolle wurde auch die mucoprotein- und mucopolysaccharidhaltige, die sogenannte Astrup-Fraktion des Harns benutzt^{15,16}; (g) mit Rücksicht auf die Angaben über die wachstumshemmende Wirkung des Serums^{17,18}, wurden auch unbehandelte Sera von Kindern in 1prozentiger Shive-Lösung verwendet.

Die Wachstumshemmung der keimenden Samen von *Lupinus albus* wird nach folgendem Verfahren nachgewiesen: Die Samen der weissen Lupine werden 2 h mit fließendem Leitungswasser gewaschen, in Petrischalen mit in Leitungswasser (24°C, chlorfrei) angefeuchteten Filterpapierstücken aufgelegt und 24 h in Dunkelheit im Thermostat bei 24°C aufbewahrt. Dann werden die Samen in Petrischalen mit auf 24°C temperiertem Leitungswasser ausgewaschen. Nichtkeimende Samen wurden jeweils ausgeschieden. Keimende Samen werden in den Schalen noch weitere 24 h belassen und nachher werden sie in die Öffnungen der vollständig mit Wasser gefüllten Reagenzgläser von 10 ml Inhalt übertragen. Nach 24 h bei 24°C

¹ H. LINEWEAVER and C. V. MURAY, J. biol. Chem. 171, 565 (1947).

² P. K. VIJAYARAGHAVAN und R. B. S. NARASINGA, Indian J. med. Res. 42, 373 (1954).

³ J. GOA, Acta chem. scand. 14, 1790 (1960).

⁴ J. SCHMID, Schweiz. med. Wschr. 81, 770 (1951).

⁵ F. ABRIGNANI und V. MUTOLO, Exper. 10, 470 (1954).

⁶ V. MUTOLO und F. ABRIGNANI, Boll. Soc. ital. Biol. sperim. 30, 379 (1954).

⁷ E. A. GREENSPAN, Science 114, 395 (1951).

⁸ K. KORSAN-BERGSTEN und L. SVENNERHOLM, Acta chem. scand. 9, 1046 (1955).

⁹ R. MEIER, B. SCHÄR und F. KRADOLFER, Exper. 13, 180 (1955).

¹⁰ M. LEDVINA, Physiol. Bohemoslov., im Druck.

¹¹ Wir danken der Forschungsstelle für Getreidezucht in Hadmersleben (Deutschland) für *Lupinus albus* Sorte Neutra, aus der Ernte 1961.

¹² H. E. WEIMER, J. W. MEHL und R. J. WINZLER, J. biol. Chem. 185, 561 (1950).

¹³ Wir möchten Herrn Ing. V. CHMELÁŘ (Med. Fak., Hradec Králové) für die liebenswürdige Überlassung von Rindermucoprotein bestens danken.

¹⁴ A. J. ANDERSON und N. F. MACLAGAN, Biochem. J. 59, 638 (1955).

¹⁵ P. ASTRUP, Acta pharmacol. toxicol. 3, 165 (1947).

¹⁶ A. J. BOLLET, M. W. SERAYDARIAN und W. F. SIMPSON, J. clin. Invest. 36, 1328 (1957).

¹⁷ F. RÖNNIKE, Dan. med. Bull. 6, 198 (1959).

¹⁸ J. ČÍŽKOVÁ-PISAŘOVICOVÁ, M. ULRYCHOVÁ und L. RUŽIČKA, Českosl. Pediatrie 14, 387 (1961).

Hemmung des Wachstums der Samen von *Lupinus albus* L. (Hadmerslebener Stamm)

No. Präparat			Konzentration	Zahl der Samen in den Testserien	Zahl der Testserien	Durchschnittlicher Zuwachs ^a in % ± s	Signifikanz des Unterschiedes zwischen dem Zuwachs des Keimes bei der Kontrolle und beim Versuch: <i>t</i> -Wert (in Klammern: Unterschied zwischen den Standardabweichungen – <i>F</i> _{0,05})	
Mensch	1	Mucoprotein des Blutplasmas (nach WEIMER; NH ₄ ⁺ -frei)	10 mg%	16	2	94,97 ± 19,70	0,72; <i>P</i> > 0,05	(1,10)
			50 mg%	8	1	75,18 ± 25,05	2,39; <i>P</i> < 0,05	(1,53)
			100 mg%	8	1	72,30 ± 29,47	2,63; <i>P</i> < 0,05	(2,66)
	2	Mucoprotein des Blutplasmas (nach WEIMER)	10 mg%	56	7	86,83 ± 30,01	2,21; <i>P</i> < 0,05	(1,08)
			50 mg%	24	3	102,19 ± 17,74	0,51; <i>P</i> > 0,05	(1,03)
			100 mg%	16	2	96,01 ± 27,11	0,46; <i>P</i> > 0,05	(1,53)
			10 mg% gekocht	16	2	91,71 ± 13,68	^b 0,74; <i>P</i> > 0,05	(2,53)
	3	Serum des Kindes	1 %	16	2	85,56 ± 30,53	1,33; <i>P</i> > 0,05	(1,51)
	4	Mucoprotein des Harns	10 mg%	16	2	50,06 ± 11,80	8,42; <i>P</i> < 0,001	(1,23)
	5	Harnfraktion nach ASTRUP	10 mg%	16	2	98,60 ± 20,19	0,23; <i>P</i> > 0,05	(1,39)
Rind	6	Mucoprotein des Blutplasmas	10 mg%	24	3	90,17 ± 27,98	1,09; <i>P</i> > 0,05	(1,43)

^a Durchschnittlicher Zuwachs bei den Kontrollen – 100%.
^b Nur in diesem Fall besteht zwischen den Standardabweichungen des Zuwachses *s*₁ (Kontrolle) und *s*₂ (Test) ein signifikanter Unterschied (*F* = 2,53 > kritischer Wert *F*_{α = 0,05} = 2,13). Ein modifiziertes Verfahren zur Errechnung des *t*-Wertes wurde hier benutzt:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_d} > \frac{v_1 t_{\alpha}(v_1) + v_2 t_{\alpha}(v_2)}{v_1 + v_2}, \quad \text{wo } s_d = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}, \quad v_1 = \frac{s_1^2}{n_1}, \quad v_2 = \frac{s_2^2}{n_2}, \quad v_1 = n_1 - 1, \quad v_2 = n_2 - 1.$$

sind die Samen zum Testen bereit. Die Länge der Keime vor dem Testen betrug in einzelnen Serien durchschnittlich 28,2–54,0 mm; die Durchschnittslängen der Keime in der Kontrollreihe und in der Versuchsreihe waren jedoch am Anfang des Versuchs immer genau gleich lang. Das Wasser in den Reagenzgläsern wurde durch SHIVES flüssigen Nährboden ersetzt (10,4 ml 0,5 M Ca(NO₃)₂, 30 ml 0,5 M MgSO₄ und 36 ml 0,5 M KH₂PO₄ in 1 l redestilliertem Wasser). Die in dieser Lösung belassenen Samen dienten als Kontrolle, während zur SHIVE-Lösung in den übrigen Reagenzgläsern die geprüften Substanzen beigelegt wurden, und zwar in solcher Menge, dass ihre endgültige Konzentration die in der Tabelle und Figur angegebenen Werte erreichte. Die Zahl der Reagenzgläser bei den Kontrollen war grundsätzlich gleich der Zahl der Reagenzgläser mit den Testlösungen. Jede Versuchsreihe enthielt 8 Kontrollen und 8 Reagenzgläser mit der Testsubstanz (bei 2 Serien ausnahmsweise je 16 Samen – siehe Figur). Mit Rücksicht auf die ungleiche Länge der Keime vor dem Anfang des Versuchs (vgl. Figur) war es nötig, die Resultate so zu modifizieren, dass die Durchschnittslänge der Keime in jeder einzelnen Kontrollreihe (in 8 Reagenzgläsern) zu Ende des Versuchs für 100% gehalten wurde; danach wurden die individuellen Ergebnisse in der Kontroll- und Versuchsreihe auf Grund dieses Wertes umgerechnet. Signifikanz der Unterschiede zwischen dem Zuwachsen der Keime bei einer Kontrolle und denen des Versuchs wurden mit Hilfe des *t*-Tests errechnet. In der Figur wird jedoch jede einzelne Testserie abgetrennt in absoluten Angaben in mm eingereiht.

Aus der Tabelle geht hervor, dass das gereinigte Mucoprotein des menschlichen Blutplasmas die Keimung der Samen schon in der Konzentration von 10 mg% um –5,03% hemmt. Die Hemmung ist statistisch nicht gesichert, aber in höheren benutzten Mucoproteinkonzentrationen ist die Hemmung grösser (–24,82% und –27,70%) und statistisch signifikant.

Das mit Hilfe der Originalvorschrift von WEIMER et al.¹² gewonnene Mucoprotein des menschlichen Plasmas hemmt in der Konzentration 10 mg% die Keimung der Samen statistisch bedeutsam um 13,1%. Bei höheren Mucoproteinkonzentrationen wurde jedoch keine Hemmung mehr festgestellt. Eine Erklärung dafür kann in Resten von Ammoniumsulfat, die in den Präparaten nach der Isolation bleiben, gesehen werden. Ammoniumsulfat, selbst in höheren Konzentrationen, verursacht dagegen eine Wachstumsbeschleunigung der Keime. In einem weiteren Blindversuch mit drei verschiedenen Konzentrationen von Ammoniumsulfat, die dem Gehalt an Ammoniumsulfat in den 10-, 50- und 100-mgprozentigen Mucoproteinlösungen entsprechen, wurden folgende Werte der Wachstumsinhibition bestimmt: +15,8; +27,1 und 20,4% (der Zuwachs bei einer Kontrollgruppe ohne Ammoniumsulfat war gleich 100%). Die höchste Aktivierung durch Ammoniumsulfat in der 50-mgprozentigen Mucoproteinlösung konnte also die Hemmungswirkung der Mucoproteine vollständig maskieren. Der Aktivations-effekt des stickstoffhaltigen Salzes in der 10mgprozentigen Mucoproteinlösung war jedoch noch nicht wesentlich. Das wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Hemmungswirkung des Mucoproteins des Rinderblutplasmas, das auch nach WEIMER isoliert, jedoch speziell gereinigt und von NH₄⁺-Ionen vollständig befreit wurde, ähnliche Werte wie bei der oben erwähnten Mucoproteinlösung aus Humanblut aufwies.

Eine absolut deutliche Hemmung (bis zu der Hälfte des Ausgangswertes) konnte man bei Harnmucoprotein feststellen. Dagegen ergab die mucoprotein- und mucopolysaccharidhaltige ASTRUPS-Harnfraktion, die mit Hilfe einer Präzipitation mit Benzidinhydrochlorid isoliert worden war¹⁶, kein statistisch gesichertes Ergebnis.

Das Resultat mit einem Kinderserum bestätigte nur die bereits zur Verfügung stehenden Literaturangaben^{17,18}.

Es zeigte sich, dass man die Ergebnisse durch weitere Versuche stützen muss, und zwar durch Testen der Hemmung des Wachstums und der Metamorphose bei Kaul-

quappen von *Rana temporaria*¹⁶. Die Versuche, deren Ergebnisse an anderer Stelle veröffentlicht werden, zeigten eine Durchschnittshemmung der Wachstumsgeschwindigkeit der Tiere beim plasmatischen Mucoprotein von –61,7%, beim Serum von –55,3%; sie ist in beiden Fällen deutlich signifikant.

Die Ergebnisse beider Vorgänge bestätigen also dieselbe Tatsache, dass Mucoproteine animalischer Herkunft das Wachstum von biologischen Individuen hemmen können.

Summary. Anti-growth activity of animal mucoproteins on germinating seeds of *Lupinus albus* was tested; the inhibition with plasma mucoprotein was statistically significant. The inhibition with urine mucoprotein according to ANDERSON was the most effective.

M. LEDVINA and J. VELTRUSKÝ

Zentrallaboratorium des Krankenhauses Olúnz in Gottwaldov (Tschechoslovakie), 29. Oktober 1962.

Extrahepatic 7 α -Hydroxylation of Dehydroepiandrosterone

In a number of papers dealing with the *in vitro* catabolism of steroid hormones, the tissue localization of the metabolic activity has been studied predominantly in the liver and the kidneys. Several authors, however, have drawn their attention also to other organs: BROWN et al.¹ investigated the *in vitro* metabolism of cortisol in various rat organs and found the metabolic activity to be present not only in the adrenals and the liver, but also in the pituitary, the gastrointestinal tract, the kidneys, and the spleen. The extrahepatic catabolism of steroid hormones involving the action of dehydrogenases and Δ^4 -hydrogenases is dealt with in several studies which are devoted almost exclusively to corticoids^{2–4}, occasionally also to progesterone⁵. In addition to endocrine organs, the extrahepatic catabolism was followed in the lungs, the kidneys, and the blood. The extrahepatic enzymatic hydroxylation of steroids *in vitro* has not yet been subjected to investigation.

Studies on the *in vitro* metabolism of 3 β -hydroxy- Δ^5 -androst-17-one (dehydroepiandrosterone – DHA)^{6–9} have as yet dealt with metabolic activity of the liver only. Our previous experiments concerned with the problem of the organ specificity of the liver in the enzymatic hydroxylation of dehydroepiandrosterone *in vitro* revealed some degree of the 7 α -hydroxylating activity to be present also in several other organs. It is for this reason that we focused our attention on the extrahepatic transformation of DHA *in vitro*.

Female rats of the Wistar strain, weighing 100 to 170 g, were used for experimentation. 2 g of fresh tissue was homogenized in 25 ml of a Krebs-Ringer phosphate buffer solution. The homogenate with glucose added (0.05%) was subsequently transferred to a solution of 2 mg of dehydroepiandrosterone in 1 ml of triethylene glycol. The mixtures were incubated at 38°C in an oxygen atmosphere over a period of 1 h. 7 α -Hydroxylation was also investigated in tris-buffer, pH 7.6, the yields being somewhat lower. Extraction of the incubation mixture with ethyl acetate, purification of the extract using chromatography on a thin layer of alumina, paper partition chromatography in the Bush B5 system, and evaluation of the chromatograms after detection with the antimony trichloride reagent were all performed as described elsewhere¹⁰.

The lung, the liver, the kidney, the spleen, the heart, the blood, the muscle, and the adrenal, respectively, were tested for their hydroxylating activity. The results were repeatedly positive with all organs examined except for the adrenals, where a definite hydroxylating activity was found only in one case. When comparing the 7 α -hydroxylating activities, considerable quantitative differences between individual organs, as well as varying results from

individual experiments, were found, perhaps owing to a lack of completely adequate homogeneity of the biological material used in the present study. The results are shown in Table I.

To obtain more thorough information regarding the properties of the extrahepatic 7 α -hydroxylating system, the results obtained for the lungs were compared with those for the liver. Because of the possibility of a species dependence of the activity of 7 α -hydroxylase¹¹, 7 α -hydroxylation of DHA was investigated also in the lungs and the livers of rabbits and calves, using identical methods. During the incubation, 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone (7 α -OH-DHA) was produced in all cases; yields from calf and rat tissues were closely parallel, whereas those from rabbit tissues were reduced to about one half.

When using thin-layer chromatography on alumina and paper partition chromatography, the chromatographic properties of the substance obtained by incubating 300 ml

Table I. Organ dependence of the *in vitro* 7 α -hydroxylation of DHA in female rats. 2 g of tissue were incubated with 2 mg of DHA

Tissue	Range of yields 7 α -OH-DHA/1 mg of DHA
	μ g
Liver	4.0 – 30.0
Lung	2.0 – 34.0
Kidney	3.0 – 78.0
Spleen	5.0 – 150.0
Heart	2.5 – 16.0
Blood	2.0 – 3.5
Muscle	4.5 – 13.5
Adrenal*	0.0 – 13.0

* 100 mg of adrenal tissue were incubated with 0.5 mg of DHA.

¹ J. H. U. BROWN, A. ANSON, and J. JACOBS, *Amer. J. Physiol.* **190**, 259 (1957).

² C. DE COURCY, *J. biol. Chem.* **229**, 935 (1957).

³ T. F. DOUGHERTY, D. L. BERLINER, and M. L. BERLINER, *Metabolism* **10**, 966 (1961).

⁴ E. L. RONGONE, *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 292 (1962).

⁵ W. G. WIEST, *J. biol. Chem.* **238**, 94 (1963).

⁶ J. J. SCHNEIDER and H. L. MASON, *J. biol. Chem.* **172**, 771 (1948).

⁷ F. UNGAR, A. M. MILLER, and R. I. DORFMAN, *J. biol. Chem.* **206**, 597 (1954).

⁸ E. J. KLEMPEN, K. D. VOIGT, and J. TAMM, *Acta endocrinol.* **36**, 498 (1961).

⁹ A. COLÁS, *Biochem. J.* **82**, 390 (1962).

¹⁰ L. STÁRKA and J. KÜTOVÁ, *Biochim. biophys. Acta* **56**, 76 (1962).

¹¹ J. J. SCHNEIDER, *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 249 (1960).