

Beeinflussung der «Adrenalin-Oxydasen» des Blutplasmas *in vivo* durch biogene Monoamine und Neuropharmaka

Als «Adrenalin-Oxydasen» (AdO) bezeichnen wir Plasmaenzyme, welche das Adrenalin in Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd zu Adrenochrom oxydieren. Uns interessierte die Frage, ob Pharmaka, welche die Überträgerstoffe des Nervensystems beeinflussen, *in vivo* die AdO-Aktivität verändern.

Methodik. (1) Gruppen von 4-16 Albinoratten mit 270 bis 290 g Körpergewicht (Männchen und Weibchen) erhielten i.p. Injektionen verschiedener Neuropharmaka. (Die Dosen sind pro Ratte angegeben.) Das Blut wurde aus der Schwanzvene entnommen nach 12 h Fasten.

Die AdO-Aktivität des Plasmas, welches von zwei unbehandelten Tiergruppen im Abstand von 1 h entnommen wurde, änderte sich praktisch nicht ($\bar{x}_1 = 20,33$, $\bar{x}_2 = 20,44$, $P < 0,8$; $\bar{x}_3 = 19,61$, $\bar{x}_4 = 19,28$, $P < 0,3$). Bei den unten beschriebenen Versuchen haben wir keine signifikanten Veränderungen des Hämatokritwertes und der Konzentration der gesamten Blutplasmaeiweiße feststellen können.

Die Enzymaktivität des Plasmas wurde mit Hilfe der folgenden Mikromethode¹ bestimmt: (2) In ein Zentrifugenglas mit 6 ml Natriumphosphatpuffer pH 6,00 wird 0,06 ml Vollblut gegeben und 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird in ein anderes Glas gebracht. In zwei Reagenzgläser pipettiert man nacheinander:

	A	B
Natriumphosphatpuffer mit Plasma	2,0 ml	2,0 ml
4% wässrige Na ₂ -EDTA-Lösung	0,1 ml	0,1 ml
Natriumphosphatpuffer pH 6,0 (96,2 ml 0,164 M NaH ₂ PO ₄ + 3,8 ml 0,630 M NaOH)	0,3 ml	0,2 ml
10 mg% Kaliumcyanidlösung	0,1 ml	0,1 ml
50 mg% Adrenalin-Stammlösung	0,1 ml	0,1 ml
3% Wasserstoffperoxydlösung	2 Tropfen	2 Tropfen

Beide Reagenzgläser werden geschüttelt und im Ultrathermostat von Höppler bei 37° 30 min lang unter Luft inkubiert. Nach der Inkubation wird in das Reagenzglas B 0,1 ml 0,25% Kaliumferricyanidlösung und nach genau 5 min in die Reagenzgläser A und B je 0,1 ml 0,5 N HCl zugefügt. Der Inhalt des Reagenzglases B wird im Verhältnis 1:1 mit Natriumphosphatpuffer pH 6,00 verdünnt. Beide Lösungen werden bei 500 m μ und 5 cm Schichtdicke gegen Phosphatpuffer im Pulfrich-Photometer photometriert. Die Enzymaktivität wird nach der Formel berechnet: $(Ext_A \cdot f + 50 - 2 Ext_B \cdot f) \cdot 1,09 = \mu M$ des oxydierten Adrenalins (1 ml Plasma) 1 h bei 37°C. f = Kalibrationskoeffizient.

Zwecks Charakterisierung der AdO haben wir Schweineserum benutzt und folgendes festgestellt²: (1) Zwischen der nach der Methode von RAVIN³ gemessenen Coeruloplasminaktivität und der AdO-Aktivität besteht keine statistische Korrelation. (2) Die Aufbewahrung des Serums bei 2-4° verursacht eine spontane AdO-Inaktivierung in den Grenzen von 60-100 h. Zur selben Zeit bleibt die Coeruloplasminaktivität auf einem hohen, den Ausgangswerten naheliegenden Niveau. (3) Unmittelbar nach der papierelektrophoretischen Trennung der Serumproteine oxydieren α - und β -Globuline in Anwesenheit von H₂O₂ Adrenalin zu Adrenochrom (bei Benutzung von hohen Substrat- und H₂O₂-Konzentrationen). Nach ungefähr 100 h Serumlagerung bei 2-4° verschwindet die Adrenochrombildung in den β -Globulinen fast vollständig, in den α -Globulinen bleibt sie dagegen weiterhin fast unverändert. (4) In Phosphatpuffer oder Serum in einer

Konzentration von 500 $\mu g\%$ gelöstes Ferritin (das in Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd Adrenalin zu oxydieren vermag⁴) weist keine AdO-Aktivität auf. (5) Plasma-Katalase ist durch Kaliumcyanid ($59 \cdot 10^{-3} \mu M/1 ml$) vollständig inaktiviert. Aktive Peroxydase⁵ und Cytochrom^{6,7} scheinen im Blutplasma nicht vorhanden zu sein. Es fehlen Literaturangaben, ob Cytochromoxydase in Blutplasma vorhanden ist⁸. Wenn die Oxydase vorhanden wäre, würde sie vermutlich durch Kaliumcyanid inaktiviert. (6) Wir haben sowohl den Einfluss der Serumkonzentration wie auch den des Substrats auf Adrenalin-oxydierung untersucht und für enzymatische Reaktionen charakteristische Kurven erhalten (Enzymsättigung durch hohe Substratkonzentrationen). Aufgrund unserer Resultate kamen wir zu dem Schluss, dass die mit der erwähnten Methode bestimmten «Adrenalin-Oxydasen» (AdO) aktive Körper von Enzymcharakter sind, die sich von Coeruloplasmin, Ferritin und Katalase unterscheiden und sich in den β -Globulinen befinden.

Resultate. *Atropin* (20 mg), *Dihydroergotoxin* (100 μg) und *Ephedrin* (150 μg) haben in der Wirkungszeit von 1-2 h keinen signifikanten Einfluss auf die AdO-Aktivität.

Histamin (2 mg) verursacht bereits nach 1 h eine sehr signifikante AdO-Aktivitätserhöhung ($\bar{x}_1 = 16,80$, $\bar{x}_2 = 19,08$, $P < 0,001$).

Adrenalin (30 μg) verursacht ebenfalls bereits nach 1 h eine sehr signifikante Erhöhung der mittleren AdO-Aktivität ($\bar{x}_1 = 13,95$, $\bar{x}_2 = 16,40$, $P < 0,001$) auch bei Tieren, die 2 h vorher Dihydroergotoxin (100 μg) erhalten haben. Die Wirkung des Noradrenalins (30 μg) ist ähnlich ($\bar{x}_1 = 19,73$, $\bar{x}_2 = 20,54$, $P < 0,05$).

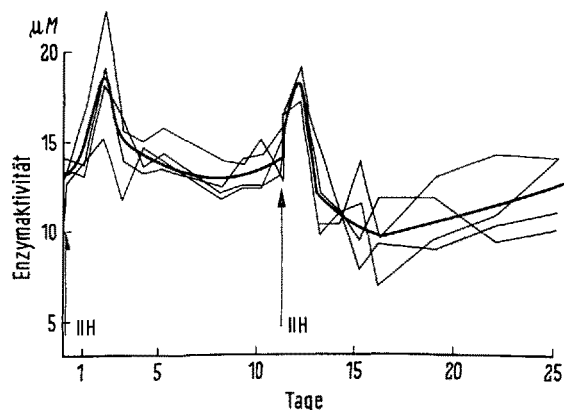


Fig. 1. Beeinflussung der AdO-Aktivität durch Iproniazid. — Einzelversuche, — Mittelwertelinie, ↑ IIIH = Iproniazidgaben von 30 mg pro Ratte.

¹ A. JASIŃSKI und W. TYBURCZYK, *Acta physiol. polon.* 12, 887 (1961).

² J. BILEWICZ-STANKIEWICZ, A. KOSSOWSKI und Z. SZCZĘKAŁA, nicht veröffentlichte Arbeit.

³ H. A. RAVIN, *Lancet* 270, 726 (1956).

⁴ A. MAZUR, S. GREEN, E. SCHORR, *J. biol. Chem.* 220, 227 (1956).

⁵ C. G. HOLMBERG und C. B. LAURELL, *Scand. J. clin. lab. Invest.* 3, 103 (1951).

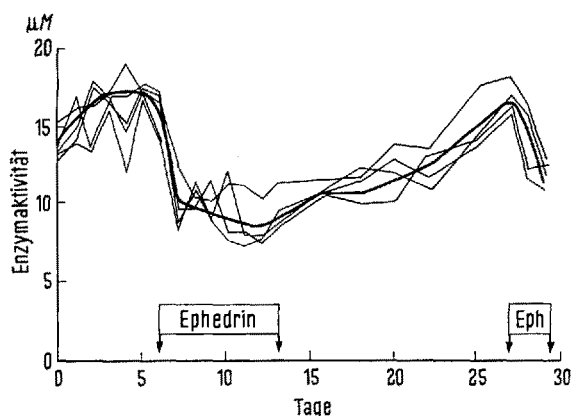
⁶ R. ABDERHALDEN, *Klinische Enzymologie* (G. Thieme, Stuttgart 1958), p. 274.

⁷ R. RICHTERICH, *Enzymopathologie* (Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1958), p. 114.

⁸ M. DIXON und E. C. WEBB, *Enzymes* (Longmans, London 1960), p. 645.

Iproniazid (Marsilid^R) hat *in vitro* in der Konzentration von $578 \cdot 10^{-3} \mu M/1$ ml keinen Einfluss auf die AdO-Aktivität¹. *In vivo* dagegen, einmal in der Dosis von 30 mg verabreicht, steigerte es deutlich die Enzymaktivität während 2 bis 3 Tagen, schon vom ersten Tage beginnend ($\bar{x}_1 = 13,64$, $\bar{x}_2 = 18,48$, $P < 0,001$) (Figur 1).

Reserpin (30 μg) verursacht 1 h nach der Verabreichung eine signifikante Steigerung der mittleren AdO-Aktivität ($\bar{x}_1 = 9,80$, $\bar{x}_2 = 12,14$, $P < 0,001$). Dieselbe Dosis, täglich während 5 Tagen verabreicht, führte zu einer sehr signifikanten Verminderung der mittleren Enzymaktivität (Kontrolltiere: $\bar{x}_1 = 12,89$ und $13,14$, $P < 0,7$; $\bar{x}_2 = 11,26$ und $8,33$, $P < 0,001$).



g. 2. Beeinflussung der AdO-Aktivität durch Ephedrin. — Einzelversuche, — Mittelwertelinie, ↓ — ↓ = Ephedrinverabreichung (150 μg täglich pro Ratte).

Ephedrin (150 μg täglich) bewirkt nach 1–2 Tagen eine deutliche, sehr signifikante Senkung der AdO-Aktivität (Kontrolltiere: $\bar{x}_1 = 13,28$, $\bar{x}_2 = 13,19$, $P < 0,9$; $\bar{x}_1 = 15,82$, $\bar{x}_2 = 9,90$, $P < 0,001$). Nach der Unterbrechung der Ephedrinverabreichung kehrt die Enzymaktivität allmählich zu den Anfangswerten zurück (Figur 2).

Unsere Resultate, die Adrenalin- und teilweise Reserpinwirkung betreffen, sind denen von NAKAJIMA und THUILLIER², die den Einfluss von neurotrophen Substanzen auf die Aktivität des Coeruloplasmins bzw. der *p*-Phenylen-diaminoxidase im Menschen- und Kaninchenserum untersucht haben, entgegengesetzt.

Summary. In rats adrenaline, noradrenaline, histamine and iproniazid induced in blood plasma a significant increase of the mean of the enzyme activity of 'adrenaline oxidases' (β -globulin-factors, different from coeruloplasmin, ferritin and catalase). Reserpine showed initially an increase and later a decrease and ephedrine caused a decrease of the enzymic activity.

J. BILLEWICZ-STANKIEWICZ,
Z. SZCZĘKAŁA und W. TYBURCZYK

Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Medizinischen Akademie in Lublin (Polen),
7. November 1962.

² H. NAKAJIMA und J. THUILLIER, *Neuropsychopharmacology* (Ed. by E. ROTHLIN, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Princeton 1961), vol. 2, p. 500.

Phosphatase Activity During the Growth and Metamorphosis of *Tribolium confusum* Duval

Although extensive studies have been made on phosphatase activity in microorganisms and in plant and animal tissues, relatively few investigations have been made with insects. Several functions have been ascribed to this group of enzymes in biological processes. They are known to play an important role in intermediary metabolism. LAMBREMONT¹ found a positive correlation between age and decreased acid phosphatase activity in *Aedes aegypti*. A possible relationship of the alkaline phosphatase system to the detoxication mechanism in resistant flies was suggested by ROCKSTEIN and INASHIMA².

Since holometabolous insects undergo metamorphosis, it was thought that a study of phosphatase activity in *Tribolium confusum* might contribute towards a better understanding of the phenomena concerning morphogenesis and growth. The present paper includes the results of this investigation.

Experimental Procedure. The methods of rearing *T. confusum* have been described earlier³. For each determination, a suitable number of insects were weighed analytically and homogenized in a Elvehjem-Potter Homogenizer in 20 vol of ice-cold double-distilled water. The homogenate was passed through a 4-layered cheesecloth to remove the cellular debris and subsequently used for the assay of phosphatase activity. Since the total

homogenate showed higher phosphatase activity than any cellular or subcellular fractions (including the high-speed supernatant fraction obtained by centrifuging the homogenate at $105\,000 \times g$ in Spinco ultracentrifuge, Model L, for 2 h), it was used as the enzymatic source. The quantitative estimation of the phosphatase activity was based upon the techniques of BODANSKY^{4,5} with some modifications. The acid and alkaline phosphatase activity was determined by measuring the inorganic phosphorus released from citrate-buffered β -glycerophosphate (pH 5.4) and tris(hydroxymethyl aminoethane) buffered β -glycerophosphate (pH 8.3) respectively. The reaction mixture was incubated for 30 min at 37°C. Initial pre-incubation of each, the buffered substrate and the homogenate separately for 5 min, was found to have a favourable effect on the enzymatic activity.

Results and Discussion. Acid phosphatase: There appears to be a relatively higher activity of this enzyme during the embryonic and larval periods of *T. confusum*

¹ E. N. LAMBREMONT, *Ann. Ent. Soc. Amer.* 53, 87 (1960).

² M. ROCKSTEIN and M. INASHIMA, *Bull. Brooklyn Ent. Soc.* 48, 20 (1953).

³ K. D. CHAUDHARY and A. LEMONDE, *Canad. J. Zool.* 40, 375 (1962).

⁴ A. BODANSKY, *J. biol. Chem.* 101, 93 (1933).

⁵ A. BODANSKY, *Amer. J. clin. Path., Tech. Suppl.* 1, 51 (1937).