

In bilharzia patients, the range of serum zinc lies between 112 and 890 with a mean value of 341 µg/100 ml, that is, there is an increase of about 84% more than the normal mean. The zinc level in urine of bilharzia patients (1.113 mg/24 h) is markedly increased. The increase is about 3 times the normal mean (0.4 mg/24 h).

As shown in the Table, serum copper of bilharzia patients ranges between 90 and 800 µg/100 ml with a mean value of 338 µg/100 ml which is about 3 times the average normal serum copper, (125 µg/100 ml). However, for copper level in urine of the patients, only 4 cases showed an increased amount, the remaining cases did not show any significant change from the normal maximum level of urinary copper.

Discussion. The main pathway of zinc excretion appears to be by the faeces, little is normally excreted by way of the urine. Zinc excretion in urine has been studied recently by some investigators. VALLEE et al.⁶ reported that 457 µg of zinc per day was lost in urine in normal adult, while PRASAD et al.⁷ found in normal adult urine an amount of 447 µg of zinc per g of creatinine. In this investigation, the average amount of urinary zinc obtained from 10 normal subjects (7 adult males and 3 females) was found equal to 0.4 mg per 24 h (Table).

According to McCANE and WIDDOWSON⁸, the amount of urinary zinc does not vary appreciably with the dietary levels of zinc. However, a significant zincuria may occur in certain pathologic conditions such as nephrosis, post alcoholic hepatic cirrhosis and certain types of porphyria patients⁹.

In this investigation, the average amount of zinc excreted in the urine of hepato-splenomegaly bilharziasis was 1.113 mg zinc per day which is about 3 times the normal mean. This increase was found to be statistically significant, $p < 0.005$. This is in agreement with the finding of VALLEE et al.⁹, who reported a mean value of 1.03 mg of zinc per day excreted in the urine of patients with liver cirrhosis. In the normal plasma, however, zinc was found to be at a concentration of 185 µg/100 ml which is near the value found by VIKBLADH¹⁰ and KOCH¹¹, who found a normal mean value of 124 and 120 µg/100 ml respectively, while PRASAD⁷ and BERFANSTAN¹² reported it as 102 and 110 µg/100 ml. The average serum zinc found in bilharziasis was 341 µg/100 ml. Compared with our normal average serum zinc, 185 µg/100 ml, there is an increase of about 84%, which is statistically significant, $p < 0.001$.

The universal distribution of copper suggested that this element participates in life processes as catalyst¹³, and it was found to be a component of a variety of oxidative enzymes. Moreover, copper is stored in the liver¹⁴ particularly in the parenchymal cells. This fact also encouraged us to estimate its level in bilharzial hepatic fibrosis.

As shown in the Table, the mean value of serum copper of the patients studied was found to be 338 µg/100 ml: a concentration which is about 3 times the normal mean

of 125%. The difference is statistically significant, $p < 0.001$. However, no significant changes occurred in the urinary copper of most of the patients. Serum copper found in our normal control, 125 µg/100 ml, agreed with the finding of WILLIAMS¹⁵ and of LAHEY et al.¹⁶ who found also an increase in the plasma copper during subacute chronic infections. The normal average urinary copper 0.016 mg/day is near that found by BUTLER and NEWMAN¹⁷, who estimated it equal to 0.018 mg/day.

As regards the protein fractions, the α_2 -globulin is also increased in most of the patients studied. This increase was found to correlate with serum copper content. In human beings 5–7% of the plasma copper is diffusible and present as free ion which is in equilibrium with and loosely attached to albumin¹⁸. The remaining 93–95% of plasma copper is carried with α_2 -globulin. The rise of α_2 -globulin is associated with chronic liver damage, as occurs in the bilharzial hepatic cirrhosis. Also the serum copper is increased with all conditions in which there is chronic tissue damage as tuberculosis and liver cirrhosis¹⁶.

Conclusion. 25 cases of bilharzia hepatic-splenomegaly were clinically examined and biochemically studied for their blood and urinary zinc and copper contents. The following conclusions may be drawn: 1. A marked increase in urinary zinc excretion appeared, but the increase is less in serum zinc. 2. The increase of serum copper correlate with the increase of α_2 -globulin and parallel the severity of liver damage. 3. No significant change in urinary copper excretion was observed.

Résumé. On a étudié le contenu en cuivre et en zinc du sérum et de l'urine des malades infectés par la bilharzie, la plupart avec cirrhose du foie. On a trouvé une augmentation notable du zinc et du cuivre dans le sérum et une augmentation élevée du zinc dans l'urine.

L. SOLIMAN, S. EL SAFOURI, G. M. MEGAHEED and G. EL MAOLA

*Biochemistry Department and Medical Department,
Faculty of Medicine, Cairo University, Cairo
(Egypt), 23 October 1974.*

- ⁶ B. L. VALLEE, L. E. WACKER, A. F. BARTHELEMY and F. HOCH, New Engl. J. Med. 257, 1055 (1957).
- ⁷ A. S. PRASAD, J. Lab. clin. Med. 61, 537 (1963).
- ⁸ R. MECANE and E. M. WIDDOWSON, Biochem. J. 36, 692 (1942).
- ⁹ B. L. VALLEE, Ann. intern. Med. 50, 1977 (1959).
- ¹⁰ I. VIKBLADH, Seend. J. clin. Lab. Invest. 2, 134 (1950).
- ¹¹ H. J. KOCH, E. R. SMITH and N. P. SHIMP, Cancer 9, 499 (1956).
- ¹² R. BERFANSTAN, Acta paediat., Stockholm 41, 389 (1952).
- ¹³ F. FLEURENT and L. LEVY, Bull. Soc. Chim. Fr. 27, 440 (1970).
- ¹⁴ M. FAYEZ and S. AZIZ, J. Egypt med. Ass. 52, 737 (1969).
- ¹⁵ R. J. WILLIAMS, Endeavour. 26, 96 (1967).
- ¹⁶ R. LAHEY, J. clin. Invest. 32, 322 (1953).
- ¹⁷ H. BUTLER and F. NEWMAN, J. clin. Path. 9, 157 (1956).
- ¹⁸ C. J. GUBLER and M. M. WINTROBE, J. clin. Invest. 33, 685 (1956).

Einfluss von Silymarin auf Keimung und embryonales Wachstum von Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.)

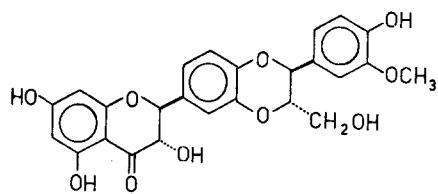
Influence of Silymarin on Germination and Embryonic Growth of Garden Cress (*Lepidium sativum* L.)

Mit dem Sammelnamen «Silymarin» bezeichnet man nach WAGNER¹ die Gesamtheit der wirksamen Inhaltsstoffe der Droge *Fructus Cardui Mariae*², der Früchte der Mariendistel (*Silybum Marianum* Gaertn.). Dieser Wirk-

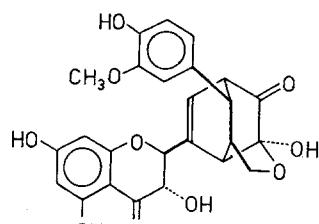
stoffkomplex zeichnet sich nach den Befunden von VOGEL et al.^{3,4} durch eine ausgeprägte antihepatotoxische Wirkung aus.

Um die Isolierung und Strukturaufklärung der wirk-

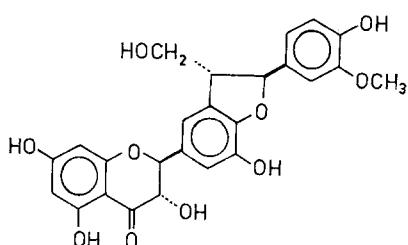
samen Komponenten des Silymarins haben sich vor allem die Arbeitskreise um HÄNSEL⁵ und um WAGNER⁶ bemüht. Danach handelt es sich bei den genannten Wirkstoffen um eine im Pflanzenreich einmalige Gruppe von Verbindungen, die gewisse Beziehungen zu den Flavonoiden einerseits und zu den Lignanen andererseits erkennen lassen, weshalb auch die Bezeichnung «Flavonolignane» für diese Stoffe in Vorschlag gebracht worden ist⁵. Die drei wichtigsten Komponenten des Silymarins sind mit den Namen Silybin (I), Silydianin (II) und Silychristin (III) belegt worden^{1,5,6}.



I



II



III

Die Tatsache, dass Silymarin bisher nur in der Gattung *Silybum* (*S. marianum*, *S. eburneum*) nachgewiesen werden konnte⁷, und ferner, dass das Vorkommen ausschliesslich auf die Früchte bzw. die Fruchtschalen beschränkt ist, während die übrigen Teile der Pflanze frei von Silymarin sind, legt die Vermutung nahe, dass dem Silymarin irgendeine spezifische Funktion, wahrscheinlich bei der Keimung oder in den frühen Entwicklungsstadien der Pflanze, zukommt. Vielleicht stellt die Bildung und Speicherung des Silymarins in den Früchten für die Gattung *Silybum* sogar einen Selektionsvorteil gegenüber anderen, Silymarin-freien Species dar.

Um diese Frage zu klären, haben wir die Wirkung der drei Hauptinhaltsstoffe des Silymarins (I-III) auf die Keimung und das frühe Wachstum von Kressekeimlingen untersucht. Dieses Testsystem war von uns bereits früher entwickelt und in einem anderen Zusammenhang mit Erfolg benutzt worden⁸.

Material und Methodik. Zur Untersuchung kamen wasserlösliche Derivate von I, II und III (Hemisuccinate, Na-Salze), die sich unter den Versuchsbedingungen als stabil erwiesen hatten⁹. Die Präparate waren dünn-schichtchromatographisch einheitlich.

Die zur Testung verwendeten Lösungen und Verdünnungen wurden mit 0,02 m-Natriumphosphat-Puffer pH 6 angesetzt. Die Kontrollen enthielten nur den Phosphatpuffer. Stabilität und pH-Konstanz (pH 6,0 ± 0,2) wurden während der gesamten Versuchsdauer kontrolliert und als zufriedenstellend befunden.

Als Versuchsobjekt wurden Samen bzw. Keimlinge von *Lepidium sativum* L. (Gartenkresse, Sorte «cresson frisé») verwendet. Es wurden nur äusserlich gesund erscheinende Samen zum Versuch herangezogen; verfärbte und in der Grösse abweichende Körner wurden vorher ausgelesen. Die durchschnittliche Keimfähigkeit lag bei ca. 95%. Von den Keimlingen wurden nur die sogenannten «Normalwachser» für den Wuchstest verwendet⁸.

Zur Feststellung des Keimverhaltens wurden je 100 Samen in Petrischalen vom Durchmesser 9 cm auf einer einfachen Lage Filterpapier gleichmässig ausgebreitet, mit 5 ml der jeweiligen Testlösung befeuchtet und 40 h im Brutschrank bei 27 °C auskeimen gelassen. Anschliessend wurden Keimlinge bzw. nicht gekeimte Samen ausgezählt und die Werte zu jenen der Kontrollen in Beziehung gesetzt.

Für den Wuchstest wurden in Leitungswasser angezogene Keimlinge in der früher beschriebenen Weise⁸ in die Testlösungen übertragen und nochmals 24 h im Brutschrank belassen. Am Beginn und am Ende des Versuches wurden die Wurzellängen mittels eines Millimeterstabes vermessen. Mittlerer Zuwachs der Keimlingswurzeln und Standardabweichungen wurden aus den individuellen Messwerten berechnet und mittels des F-Testes auf ihre Signifikanz geprüft. Für jede Konzentration der Testlösungen und der Kontrollen wurden 120 bis 180 Keimlinge verwendet.

Ergebnis. Auf die Keimung der Kressesamen zeigen die geprüften Wirkstoffe (I-III) keinen äusserlich erkennbaren Einfluss. Die Abweichungen von den Kontrollen sind insignifikant (Tabelle).

¹ H. WAGNER, Arzneimittel-Forsch. 24, 466 (1974).

² DAB 6, Erg.-B.6, Marienkörner, Stechkörner; H. SCHINDLER, Arzneimittel-Forsch. 2, 295 (1952).

³ G. HAHN, H. D. LEHMANN, M. KÜRTEN, H. UEBEL und G. VOGEL, Arzneimittel-Forsch. 18, 698 (1968). - G. VOGEL, Arzneimittel-Forsch. 18, 1063 (1968). - G. VOGEL and I. TEMME, Arzneimittel-Forsch. 19, 613 (1969).

⁴ G. VOGEL, W. TROST, R. BRAATZ, K. P. ODENTHAL, G. BRÜSEWITZ, H. ANTWEILER und R. SEEGER, Arzneimittel-Forsch. 25, 82 (1975).

⁵ B. JANIAK und R. HÄNSEL, Planta med. 8, 71 (1960). - R. HÄNSEL und G. SCHÖPFLIN, Tetrahedron Lett. 1967, 3645. - A. PELTER und R. HÄNSEL, Tetrahedron Lett. 1968, 2911. - R. HÄNSEL, J. SCHULZ, A. PELTER, H. RIMPLER und A. F. RIZK, Tetrahedron Lett. 1969, 4417.

⁶ H. WAGNER, L. HÖRHAMMER und R. MÜNSTER, Naturwissenschaften 52, 305 (1965); Arzneimittel-Forsch. 18, 688 (1968). - H. WAGNER, Arzneimittel-Forsch. 18, 696 (1968). - D. J. ABRAHAM, Tetrahedron Lett. 1970, 2675. - H. WAGNER, Tetrahedron Lett. 1971, 1895.

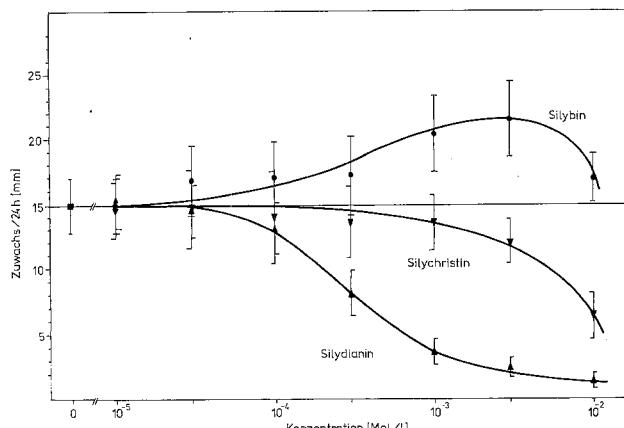
⁷ G. HALBACH und K. GÖRLER, Planta med. 19, 293 (1971). - G. HALBACH und W. WINKLER, Z. Naturforsch. 26b, 971 (1971).

⁸ H. KOCH, Scientia pharmac. 39, 209 (1971).

⁹ Herrn Dr. G. HALBACH, in Firma Dr. Madaus, Köln, danken wir für die Überlassung der Testsubstanzen.

Keimverhalten von Kressesamen unter dem Einfluss von Silybin (I),
Silydianin (II) und Silychristin (III)

Testsubstanz	Konzentration (M/l)	Ausgekeimte Samen (%)
I	10^{-2}	94 ± 2
I	10^{-3}	93 ± 3
I	10^{-4}	95 ± 4
II	10^{-2}	92 ± 3
II	10^{-3}	94 ± 3
II	10^{-4}	94 ± 2
III	10^{-2}	93 ± 3
III	10^{-3}	94 ± 2
III	10^{-4}	94 ± 2
Kontrolle	—	95 ± 3



Dosis-Wirkungs-Kurven und Standardabweichungen von Silybin, Silydianin und Silychristin im Wuchstest an Kressekeimlingen.

Völlig anders erscheint das Bild jedoch wenn man das frühe Wachstum der Kressekeimlinge unter dem Einfluss steigender Konzentrationen der Wirkstoffe (I-III) betrachtet (Figur).

Im Wuchstest erweist sich Silybin (I) als starker Aktivator des Wurzelwachstums. Der fördernde Effekt ist deutlich dosisabhängig und zeigt ein Maximum bei einer Konzentration von etwa 3×10^{-3} M/l. Bei noch

höheren Konzentrationen sinkt die fördernde Wirkung zuschends ab, um schliesslich in eine Hemmwirkung umzuschlagen. Dieser Effekt ist jedoch unspezifisch und wahrscheinlich auf eine osmotische Schädigung durch überstarke Ionenkonzentrationen zurückzuführen. Bei einer Konzentration von 10^{-5} M/l und darunter wird die Abweichung von den Kontrollen insignifikant.

Im Gegensatz zu I zeigt Silydianin (II) eine starke Hemmwirkung auf das frühe Wachstum der Kressewurzel. Der inhibitorische Effekt tritt im Konzentrationsbereich zwischen 10^{-4} und 10^{-2} M/l zutage und ist ebenfalls dosisabhängig. Umsetzversuche haben ergeben, dass die Wirkung reversibel ist; die gehemmten Pflänzchen erholen sich nach Übertragung in Pufferlösung und wachsen dann normal weiter. Der Effekt ist auch bei den höchsten Konzentrationen nicht letal.

Wiederum gänzlich andersartig verhält sich Silychristin (III). Hier tritt weder eine Aktivierung, noch eine nennenswerte Inhibition in Erscheinung. Nur bei den höchsten Konzentrationen ist eine gewisse Retardierung des Wurzelwachstums gegenüber den Kontrollen feststellbar, die aber aus den oben dargelegten Gründen als unspezifisch anzusehen ist.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist insofern bedeutsam, als in den Wirkstoffen I-III drei chemisch nahe verwandte (strukturisomere) Verbindungen vorliegen, die zudem biogenetisch in enger Beziehung zueinander stehen. Die unterschiedliche Wirkungsweise deutet auf eine Beteiligung an einem noch nicht näher bekannten, diffizilen Steuerungsmechanismus im Wachstumsprozess der Pflanzen hin. Wir glauben Hinweise in Händen zu haben¹⁰, wonach die im Silymarin enthaltenen Substanzen an der Regulation des Phytohormonspiegels teilnehmen und auf diese Weise eine spezifische Funktion in bestimmten Entwicklungsstadien ausüben. Zur Klärung dieser Frage sind zur Zeit weitere Versuche im Gange.

Summary. Silybine, silydianine and silychristine, three components of silymarine, the active principle of *Silybum marianum* Gaertn., exert different but significant and dose dependent effects on the growth of seedlings of *Lepidium sativum* L.

H. KOCH

*Pharmazeutisch-Chemisches Institut der Universität,
Währingerstrasse 10, A-1090 Wien (Österreich),
7. November 1974.*

¹⁰ Unveröffentlichte eigene Versuche.

Les acides nucléiques du muscle de la truite arc-en-ciel d'élevage (*Salmo gairdnerii* Richardson): Variations liées à la maturité sexuelle

Nucleic Acids Content in Muscular Tissue of the Rainbow Trout (*Salmo gairdnerii* Richardson): Variations Related to Gonad Maturation

Dans des études antérieures, nous nous sommes attachés à vérifier l'influence de l'état de maturité sexuelle sur la composition biochimique du muscle de la truite arc-en-ciel d'élevage (*Salmo gairdnerii* Richardson). Nous avons ainsi étudié la teneur en eau et en protéines¹, la teneur en glycogène, en lipides et en composés minéraux², les effets de l'adrénaline sur les animaux mâle et femelle³. Nous avons constaté que les truites en période d'activité sexuelle présentaient une très forte diminution du taux des divers constituants cellulaires étudiés. Il nous a paru

intéressant de rechercher si la teneur en acides ribonucléiques (ARN) et désoxyribonucléiques (ADN) subissaient des variations du même type.

¹ J. GRAS, R. REYNAUD, L. GAMOTY, J. FREY et J. C. HENRY, *Experientia* 23, 430 (1967).

² J. GRAS, R. REYNAUD, L. GAMOTY, J. FREY et J. C. HENRY, *Experientia* 23, 431 (1967).

³ H. PERRIER, C. PERRIER, Y. GUDEFIN et J. GRAS, *Comp. Biochem. Physiol.* 43A, 341 (1972).