

Punktierung wieder aus den Eiern entnommen und in Abständen von sechs Stunden in eines der infizierten Kaninchen eingespritzt. Das Kaninchen bleibt am Leben. Das zweite der infizierten Tiere erhält ebenfalls alle sechs Stunden eine Injektion von 1 cm³ Blutegelbazillenaufschwemmung in Kaninchenserum. Auch dieses Kaninchen übersteht die Krankheit in der gleichen Weise wie das erste Kaninchen, während das dritte infizierte Tier stirbt. Dieser Versuch ergibt die Wirkung der Behandlung mit Blutegelbazillenaufbereitungen.

Diese Blutegelbakterien wurden von uns wie folgt gezüchtet: frisches Schweine- oder Rinderblut unter Zusatz von Gelatine und eines Tropfens Eisenglycerinphosphatlösung wird in einen evakuierten Kaltsterilisationsapparat gebracht und sofort mit Äther-Chloroform-Dämpfen sterilisiert. Nach Impfung der Nährböden z. B. mit dem Verdauungsschleim des Blutegels mit Hilfe einer Platinnadel entwickeln sich in kurzer Zeit Reinkulturen der Blutegelbakterien. Abschwemmungen dieser Blutegelbakterien werden keimfrei filtriert. Bei Zugabe von Vitamin H zu den Nährböden erhalten wir Virulenzsteigerung. Die Hemmungswirkung von keimfrei filtrierten Blutegelbazillenaufschwemmungen – von uns kurz Subtiligin H genannt – gegen *St. aureus* zeigt sich noch in der Verdünnung 1:80 Millionen (bezogen auf Trockensubstanz und Oxford-einheit).

P. WEILER

Laboratorium der Terrachemie, Freiburg i. Br., den 8. Juni 1949.

Summary

In a series of experimental reports it is shown that the leech's organism has the capacity to weaken pathogenic microorganisms even to complete loss of their infectiousness.

Production of vaccine in the leech, as well as a combined treatment with vaccine and own blood, are described.

Furthermore, it proved that weakening of the infectious agent can also be achieved immediately by treatment with leech bacilli or with germ-free filtrates from such cultures (Subtiligin H).

Die Wirkung von Patulin auf das myelo- und lymphopoetische System der Maus

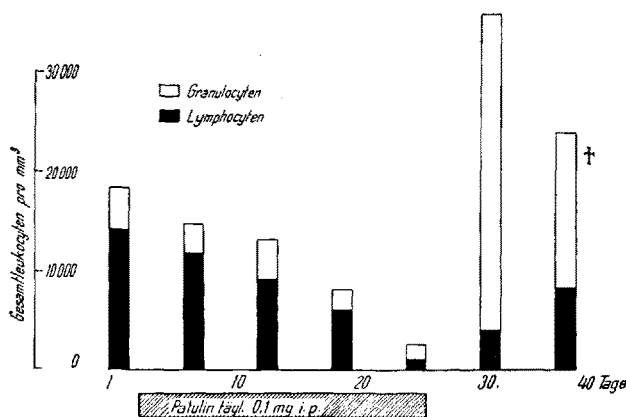
Patulin wird von *Penicillium patulum* und verschiedenen anderen Schimmelpilzen gebildet. Es hat eine sehr starke antibiotische Wirksamkeit gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien sowie auch gegenüber Tuberkelbazillen. Patulin wirkt aber auch auf pflanzliche und tierische Zellen sehr toxisch bzw. wachstumshemmend (GÄUMANN, JAAG und BRAUN¹, O. JIROVEC², H. KEILOVA³, BROOM⁴ et al., WANG⁵).

Bei der Prüfung von zytostatisch wirksamen Stoffen, die eventuell bei der Therapie von Neoplasmen von Bedeutung sein könnten, ist es von größter Wichtigkeit, zu wissen, ob der betreffende Stoff eine selektiv hemmende Wirkung auf in Wachstum begriffene Gewebe hat. Da die blutbildenden Gewebe die am stärksten in Proliferation sich befindenden tierischen Gewebe sind, haben wir Patulin daran geprüft. Wir haben zwei Gruppen von je 10 männlichen weißen Mäusen von ca. 20 g Gewicht täglich 0,075 bzw. 0,1 mg Patulin intraperitoneal in-

jiziert. Wir verwendeten eine 1/2%ige Lösung von Patulin in Phosphatpuffer ($p_H = 6,3$), die ständig bei 0° C aufbewahrt wurde¹.

Die Leukozytenzahl sowie das weiße Blutbild wurden 2–3mal wöchentlich untersucht. Die Blutentnahmen erfolgten aus den Schwanzvenen.

Wir beobachteten bei allen Tieren, die 0,1 mg Patulin erhielten, einen allmählichen Rückgang der Gesamtleukozytenzahl. Mit 0,075 mg war nur selten diese Wirkung zu erzielen. Bei der Berücksichtigung des Differentialblutbildes konstatierten wir, daß die Lymphozyten einen sehr starken Abfall im peripheren Blut aufwiesen, während die Granulozytenzahl ungefähr konstant blieb. Die Lymphozytenzahl, die bei der Maus normalerweise 70–90 % der Gesamtleukozytenzahl ausmacht, sank meistens innert 3–4 Wochen bis auf 10–30 % ab, oder in absoluten Zahlen ausgedrückt, durchschnittlich von 8–15 000 auf 1–3 000. Ferner beobachteten wir, daß nach Absetzen der Injektionen ein Anstieg der Lymphozytenzahl erfolgte, der manchmal mit einem reaktiven Granulozytenanstieg einherging (siehe Abbildung).



Leukozytenwerte bei einer mit Patulin behandelten Maus.

In einzelnen Fällen überlebten die Tiere so lange, bis es zu einer vollständigen Normalisierung des Blutbildes kam. Oft gingen die Tiere nach Absetzen der Injektionen an Eiterungen, die wir im subkutanen Gewebe, im Peritoneum, in der Leber, in den Nieren, im Perikard fanden, zugrunde. Möglicherweise spielte die fehlende Infektionsabwehr der Lymphozyten dabei ursächlich eine Rolle. Als Zeichen der Schädigung des lymphatischen Gewebes ließ sich oft eine Atrophie der Milzfollikel feststellen.

Die Eigenschaft des hemmenden Einflusses auf das lymphatische Gewebe hat Patulin also mit anderen zytostatischen Stoffen, wie Urethan, Nitrogen mustard, gemeinsam. Patulin bewirkt eine allgemeine erhöhte Gefäßdurchlässigkeit, die u. a. zu Lungenödem führt², so daß einer höheren Dosierung Grenzen gesetzt sind. Trotzdem versuchen wir jetzt, ob bei geeigneter Dosierung ein wachstumshemmender Effekt bei Mäuseleukämien und Tumoren zu erreichen ist.

W. BOLLAG

Medizinische Universitätsklinik Zürich, den 30. Juni 1949.

¹ E. GÄUMANN, O. JAAG und R. BRAUN, Exper. 3, 70 (1947).

² O. JIROVEC, Exper. 5, 74 (1949).

³ H. KEILOVA, Exper. 5, 242 (1949).

⁴ W. A. BROOM et al., Brit. J. Exp. Pathol. 25, 195 (1944).

⁵ F. H. WANG, Bot. Bull. Academia Sinica 2, 265 (1948).

¹ Patulin wurde uns in freundlicher Weise vom Institut für Spezielle Botanik ETH. (Dir. Prof. GÄUMANN) zur Verfügung gestellt.

² W. A. BROOM et al., Brit. J. Exp. Pathol. 25, 195 (1944).

Summary

Patulin was examined in regard to its effect upon the different white blood cells in white mice. There is a very noticeable influence on the lymphocyte count in the circulating blood, which was reduced by daily injections of patulin 0.1 mg i.p. from 8–15,000 to 1–3,000, while the granulocytes were scarcely affected. After the injections were stopped, the lymphocyte count increased again, and sometimes an increase of the granulocytes has been noticed. Often mice died from abscesses in different organs. Patulin seems to have an inhibitory effect on lymphatic tissues, like carbamates and nitrogen mustard. Whether there is a growth inhibitory effect on tumours is now an object of study.

Sur la présence dans le sang circulant
d'un substrat de la D-acidaminodéshydrase

Dans deux publications antérieures¹, nous avons montré que l'action d'une préparation de D-acidaminodéshydrase (AAD) sur du sang ou du plasma sanguin se traduisait par la formation d'ammoniaque et l'absorption d'oxygène. Le phénomène est si net que l'on songe immédiatement à une désamination oxydative; il faudrait donc envisager la présence dans le sang circulant d'un substrat de la D-AAD. Etant donné ce que nous savons de la spécificité d'action de cette diastase, il y aurait une forte probabilité pour qu'il s'agisse d'un ou de plusieurs D-amino-acides. Ainsi s'expliquerait le fait en apparence paradoxal que constitue la présence dans certains tissus, à une concentration élevée, d'un enzyme agissant sur des composés que l'on ne rencontre qu'exceptionnellement dans l'organisme. Un pas décisif serait fait vers la solution du problème de la signification physiologique de la D-AAD, solution que les constatations expérimentales antérieures n'avaient pu que suggérer² sans parvenir à lui donner une forme précise et une base solide.

On peut évidemment opposer à l'interprétation de nos premiers résultats des objections sérieuses. En effet, d'une part, nous utilisons une préparation brute de D-AAD; d'autre part, le sang ou le plasma contiennent un grand nombre de substances oxydables ou génératrices d'ammoniaque. Il est évidemment peu probable que les deux processus d'ammoniogenèse et de consommation d'oxygène soient indépendants, mais cette éventualité ne peut cependant être écartée avec une certitude absolue. Si, d'une façon générale, la quantité d'oxygène disparue est d'autant plus grande qu'il y a plus d'ammoniaque formée, la correspondance est très approximative; pour une molécule de NH₃ dégagée, il y a une fixation de 0,5 à 1 molécule de O₂ et parfois même davantage³. Ces discordances peuvent naturellement trouver des explications, mais celles-ci restent du domaine de l'hypothèse.

La question nous a semblé suffisamment importante pour que nous nous efforcions de lui apporter de nouveaux éclaircissements. L'isolement du substrat sanguin posait des problèmes techniques délicats et longs à résoudre, et nous avons préféré commencer par éliminer

les causes d'erreurs provenant de la préparation enzymatique en purifiant celle-ci dans toute la mesure du possible.

L'extrait brut de poudre de rein de porc (déshydraté et desséchée par l'acétone et l'éther sulfurique) a été traité selon la méthode de WARBURG et CHRISTIAN¹ jusqu'à la scission de la D-AAD exclusivement². Nous avons vérifié que la diastase ainsi préparée désaminait encore fortement la D-alanine, mais comme il y a toujours par rapport à l'extrait initial une perte sensible d'activité, due surtout à une scission et une destruction partielles du groupement prosthétique au cours des premières opérations, nous avons ajouté à l'enzyme purifiée une solution de flavine-adenine-dinucléotide pur préparé à partir de la levure (GRIESE, in: WARBURG et CHRISTIAN, loc. cit.). Les précipitations étant réalisées avec des solutions concentrées de sulfate d'ammonium, la préparation diastasique retient des quantités relativement importantes de ce sel; nous ne pouvions donc songer à doser l'ammoniaque dans les liquides d'expérience, et nous devons nous borner à comparer les consommations d'oxygène.

Si l'on fait agir sur un même plasma sanguin l'extrait rénal original, la D-AAD purifiée et la D-AAD additionnée de flavine-adenine-dinucléotide, on constate que la quantité d'oxygène fixée, très importante pour la diastase brute, est très faible pour la préparation pure, mais que la présence d'un excès du groupe actif augmente nettement la consommation de O₂. Cet effet activateur du flavine-adenine-dinucléotide nous est apparu comme un argument sérieux en faveur de la réalité d'un processus de désamination oxydative. Mais seule la constatation d'une formation simultanée d'ammoniaque pouvait nous apporter la preuve souhaitée. Nous avons donc modifié la technique de purification de la D-AAD en remplaçant le sulfate d'ammonium par le sulfate de sodium à des concentrations correspondantes; la vérification de l'activité des préparations, en utilisant la D-alanine comme substrat, a été tout à fait satisfaisante.

Nous résumons dans le tableau ci-dessous quelques-uns de nos résultats expérimentaux.

Sang N°		Témoin sang	Sang + D-AAD brute		Sang + D-AAD purifiée		Sang + D-AAD purifiée + FADn	
				Témoin sang dé-falqué		Témoin sang dé-falqué		Témoin sang dé-falqué
I	QO ₂	6,3	33,7	27,4	4,1	—	25,1	18,8
	QN ₃	3,7	13,7	10,0	5,0	1,25	7,5	3,75
II	QO ₂	22,5	48,2	25,7	17,8	—	27,6	5,1
	QN ₃	11,6	19	7,4	7,5	—	14,1	2,5
III	QO ₂	14,4	62,6	48,1	18,5	4,1	32,8	18,4
	QN ₃	2,5	8,75	6,25	2,5	—	10,0	7,5
IV	QO ₂	19,8	83,3	63,5	5,0	—	25,9	6,1
	QN ₃	7,5	13,1	5,6	5,0	—	14,3	6,8

NB. — QO₂ est exprimé en µg de O₂ p. ml de sang,
—QN₃ est exprimé en µg de N/NH₃ p. ml de sang.

¹ Pour ces 2 premières notes, cf. a) C. R. Soc. Biol. 140, 522 (1946); b) 14e Réunion de l'Ass. des Physiol., Lyon, in: Arch. Int. de Physiol. 54, 125 (1946).

² Cf. notamment la série d'articles d'EDLBACHER et de ses élèves dans Helv. chim. acta, 28 et 29.

³ La présence constante de catalase dans toutes les préparations écarte l'hypothèse d'une persistance ou d'une destruction incomplète de H₂O₂ formé dans la réaction.

¹ Bioch. Z. 98, 150 (1938).

² La séparation de la protéine et du groupement prosthétique ne constitue pas en effet à proprement parler un stade de purification supplémentaire, et comme elle entraîne une diminution très appréciable d'activité, nous avons préféré y renoncer.