

*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-acidaminodéhydrase**

Dans deux publications antérieures<sup>1</sup>, nous avons montré que l'action d'une préparation de D-acidaminodéhydrase (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 suggérer<sup>2</sup> 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 utilisions 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'ammoniogénèse 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  $\text{NH}_3$  dégagée, il y a fixation de 0,5 à 1 molécule de  $\text{O}_2$  et parfois même davantage<sup>3</sup>. 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 efforçions 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 (déshydratée et desséchée par l'acétone et l'éther sulfurique) a été traité selon la méthode de WARBURG et CHRISTIAN<sup>1</sup> jusqu'à la scission de la D-AAD exclusivement<sup>2</sup>. 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 purifié une solution de flavine-adénine-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 devions 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-adénine-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  $\text{O}_2$ . Cet effet activateur du flavine-adénine-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 défaillé	Témoin sang défaillé	Témoin sang défaillé
I QO <sub>2</sub> QNH <sub>3</sub>	6,3 3,7	33,7 13,7	27,4 10,0	4,1 5,0
II QO <sub>2</sub> QNH <sub>3</sub>	22,5 11,6	48,2 19	25,7 7,4	17,8 7,5
III QO <sub>2</sub> QNH <sub>3</sub>	14,4 2,5	62,6 8,75	48,1 6,25	18,5 2,5
IV QO <sub>2</sub> QNH <sub>3</sub>	19,8 7,5	83,3 13,1	63,5 5,6	5,0 5,0

*N.B. – QO<sub>2</sub> est exprimé en µg de O<sub>2</sub> p. ml de sang,  
– QNH<sub>3</sub> est exprimé en µg de N/NH<sub>3</sub> p. ml de sang.*

<sup>1</sup> 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).

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

<sup>3</sup> La présence constante de catalase dans toutes les préparations écarte l'hypothèse d'une persistance ou d'une destruction incomplète de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formé dans la réaction.

<sup>1</sup> Bioch. Z. 98, 150 (1938).

<sup>2</sup> 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.

On voit que la diastase purifiée ne donne lieu généralement qu'à une faible consommation d'oxygène et à une formation d'ammoniaque pratiquement nulle; au contraire, la D-AAD purifiée «reconstituée» par addition de flavine-adénine-dinucléotide donne des résultats nettement positifs, et si les chiffres sont plus faibles qu'avec la préparation brute, ils se correspondent mieux.

En conclusion, l'action de la D-AAD purifiée du rein de porc sur le plasma sanguin conduit à des résultats analogues à ceux que nous avions obtenus avec les extraits bruts, et nos déductions antérieures concernant la présence dans le sang d'un substrat de la D-AAD se trouvent ainsi confirmées.

P. BOULANGER, G. BISERTE et R. A. GRIFFIÉ

Services de biochimie et de physiologie de la Faculté de médecine et de l'Institut de recherches sur le cancer, Lille, le 25 juillet 1949.

#### Summary

When raw D-acidaminodehydrase (AAD) from pig kidney acts upon blood plasma, O<sub>2</sub> is consumed and NH<sub>3</sub> is formed; this suggests that an oxidative deamination is taking place, and the occurrence in the blood of a substrate for the D-AAD seems probable. These results are confirmed by the use of purified D-AAD and by the striking activation of the reaction when pure riboflavin-adenine-dinucleotide is added.

#### Über die Hemmung von Desoxyribonucleotide spaltenden Fermenten durch Colchicin

Die Wirkungsweise der Mitosegifte ist nur für einen kleinen Teil dieser chemisch außerordentlich verschiedenen Substanzen bekannt. Wir haben uns daher die Frage vorgelegt, ob Mitosegifte durch die Beeinflussung derjenigen Fermente wirken können, welche möglicherweise am Stoffwechsel von Zellkernsubstanzen beteiligt sind und eine Rolle bei der Vermehrung der Kernsubstanzen während der Zellteilung spielen. Diesbezügliche Untersuchungen sind in der Literatur bisher nicht mitgeteilt worden. Lediglich Urethan ist hinsichtlich der Pharmakologie der Narkose eingehender ferment-chemisch untersucht worden, während Colchicin wegen der Beeinflussung der Gicht von KEESER<sup>1</sup> geprüft worden ist, ohne daß Zusammenhänge zwischen dem Einfluß auf diese Krankheit und der Mitosegiftwirkung vermutet oder untersucht worden sind.

In unseren Versuchen hat sich Colchicin als recht wirksam erwiesen; deshalb soll über diesen Teil unserer experimentellen Daten hier kurz berichtet werden. Die Prüfung der Desoxyribonucleotidase erfolgte nach dem Vorgehen von GREENSTEIN und Mitarbeitern<sup>2</sup>, als Substrat dienten aus Rindermilz nach BREDERECK<sup>3</sup> dargestellte Desoxyribonucleotide. Dabei zeigte sich eine Hemmung der Phosphatabspaltung um über 50% (siehe Tab. I).

Diese Ergebnisse decken sich mit den uns erst während unserer Untersuchung bekanntgewordenen Befunden von AHLSTRÖM, v. EULER und v. HEVESY<sup>4</sup>, wo-

Tabelle I

	Zunahme an anorganischem Phosphor in γ je Ansatz nach		
	1 Stunde	2 Stunden	3 Stunden
Ohne Colchicin	+ 38,0	+ 62,0	+ 57,0
Mit Colch. 1,2 · 10 <sup>-2</sup> mol	+ 28,0	+ 16,0	+ 21,0

nach der Phosphatumsatz in Zellkernen des Jensen-Sarkoms, gemessen mittels P<sup>32</sup>, durch Colchicininjektion bei Ratten um etwa 20% gesenkt werden kann.

Die gleichzeitig von uns untersuchte enzymatische Desaminierung von Desoxyribonucleotiden ist ebenfalls durch Colchicin um etwa 40% hemmbar, wie aus Tab. II hervorgeht (Ansatz nach GREENSTEIN<sup>1</sup>).

Tabelle II

	Zunahme an N in γ je Ansatz nach	
	2 Stunden	4 Stunden
Ohne Colchicin	+ 8,1	+ 19,5
Mit Colchicin 1,2 · 10 <sup>-2</sup> mol	+ 5,1	+ 7,8

Die Versuche werden fortgesetzt und sollen zusammen mit anderen hier nicht erwähnten Befunden in Kürze an anderer Stelle publiziert werden.

Der Firma Hoffmann-La Roche AG. Basel sind wir für die liebenswürdige Überlassung von Colchicin zu großem Dank verpflichtet.

K. LANG, G. SIEBERT und H. OSWALD

Physiologisch-chemisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, den 12. Juli 1949.

#### Summary

The authors raise the question, if enzymatic processes possibly linked with the mitotic cell division may be influenced by mitotic poisons. The presented date show an inhibition of the dephosphorylation of desoxyribonucleotides at a rate of about 50% and of the deamination of about 40% by colchicine (final concentration 1 · 2 · 10<sup>-2</sup> M).

<sup>1</sup> J. P. GREENSTEIN, C. E. CARTER und H. W. CHALKLEY, loc. cit.

#### Inhibition with Merthiolate of the Mucooligosaccharase Fraction of Testis Hyaluronidase (Mesomucinase)

The observation that the aqueous extract of mammals' testicles, as well as the aqueous extract of leech head, the poison of some snakes, and the filtrates of agar cultures of some microorganisms could split hyaluronic acid, first by lowering the viscosity of a solution of that acid and, only after a certain period of time, by liberating its components (acetylglucosamine and glucuronic acid), led even the first investigators (FAVILLI<sup>1</sup>, MEYER and coworkers<sup>2</sup>) to suppose that testis extract contained a mixture of enzymes.

<sup>1</sup> G. FAVILLI, Boll. Ist. Sieroter. Milanese 19, 481 (1940).

<sup>2</sup> K. MEYER, E. CHAFFEE, G. HORBY, and M. H. DAWSON, J. Exp. Med. 73, 309 (1941).