

tine, prostaglandin, pilocarpine, histamine, 5-hydroxytryptamine (5-HT), and acetylcholine (Fig. 1). The substances are mentioned in the order of sensitivity to the inhibition by patulin, nicotine-induced spasm being the most easily inhibited.

Concentrations up to 15 µg patulin/ml bath fluid did not, however, influence the contractions induced by barium chloride or by substance P. The effect of substance P was actually enhanced in most cases (Fig. 2). At concentrations higher than 30 µg/ml bath fluid the effects of barium chloride and substance P were more or less inhibited, but in some cases not completely abolished even after adding 100 µg patulin/ml. The effect of patulin developed slowly and it became almost irreversible.

It seems more or less generally accepted that nicotine gives rise to contraction of the isolated guinea-pig ileum by stimulating the nervous structures of the intestinal wall; that histamine, acetylcholine, and barium chloride stimulate both the nervous structures and the smooth muscle cells directly, and that substance P and prostaglandin (to be published) only stimulate the smooth muscle cells directly. These conclusions have been drawn from experiments which in most cases were based on so-called 'pharmacological histology analyses'.

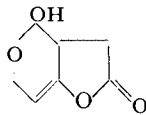
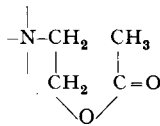


Fig. 3.—Structural formula for patulin.

From the formula given in Figure 3 it is obvious that patulin has chemical similarities with 5-HT, histamine, nicotine, pilocarpine, and acetylcholine, particularly if the acetylcholine molecule is shown in this general form:



The findings in this investigation would seem to suggest that patulin acts as an antimetabolite in some enzymatic reaction by which the substances mentioned above give rise to a contraction of the isolated guinea-pig ileum. Substance P (a polypeptide) and barium chloride (an inorganic compound) would thus seem to activate the contractile system in a different way.

R. ELIASSON

Department of Physiology, Faculty of Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, July 4, 1958.

Zusammenfassung

Patulin verhindert die Kontraktion des isolierten Meerschweinchenileums, verursacht durch Nikotin, Histamin, 5-Hydroxytryptamin, Pilocarpin, Acetylcholin und Prostaglandin. Die Kontraktion, verursacht durch Substanz P und Barium Chloride, wird nicht verhindert.

Numalnarkose und anti-inflammatorische Wirkung von Phenylbutazon

In einer früheren Arbeit (DOMENJOZ *et al.*<sup>1</sup>) teilten wir mit, dass die am Formalin- und Dextranödem der Ratte erfassbare anti-inflammatorische Wirksamkeit von Natriumalicylat durch eine gleichzeitige Numalnarkose deutlich abgeschwächt wird. Hingegen liess sich unter identischen Versuchsbedingungen für die Entzündungshemmung durch Phenylbutazon an der Formalin-arthritis eine gleichartige Abhängigkeit nicht nachweisen (ohne Narkose: 60% Hemmung; mit Narkose: 64% Hemmung). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass bei Ratten nach mehrtägiger Vorbehandlung mit Schilddrüsenextrakt bzw. Thyroxin ein starker Verlust des antiphlogistischen Wirkungsgrades des Phenylbutazon eintritt, wenn die Tiere gleichzeitig mit Numal (Diäthylaminsalz der Isopropylallylbarbitursäure) narkotisiert wurden.

Antiphlogistische Wirkung von Phenylbutazon 200 mg/kg subkutan am Formalinödem mit Schilddrüsenextrakt bzw. Thyroxin vorbehandelter Ratten mit und ohne Numalnarkose.

K = Kontrollen Ph = Phenylbutazon

Mit Narkose				Ohne Narkose			
Tierzahl	Tiergewicht g	Schwellung in mm <sup>3</sup>	Hemmung in %	Tierzahl	Tiergewicht g	Schwellung in mm <sup>3</sup>	Hemmung in %
Schilddrüsenextrakt							
K 20	152	276	—	26	146	250	—
Ph 25	145	197	29	27	148	77	69
Thyroxin							
K 27	134	332	—	20	126	203	—
Ph 26	133	336	1	9	126	72	65

Methodik. Der Entzündungsversuch erfolgte nach der Methode von DOMENJOZ *et al.*<sup>1</sup>. Als entzündliches Agens injizierten wir männlichen, weissen Ratten 0,1 cm<sup>3</sup> Formalin 3%ig subplantar in die linke Hinterpfote. Phenylbutazon (Butazolidin Geigy) wurde in einer Dosis von 200 mg/kg subkutan 30 min vor Formalin verabreicht. Als Narkotikum applizierten wir Numal (W. Z. Roche) in einer Dosierung von 100 mg/kg subkutan 45 min vor Injektion des Phenylbutazon. Die Ödemintensität erfassen wir 135 min nach der Formalinverabreichung.

Die Tiere wurden vorbehandelt mit Schilddrüsenextrakt 7 Tage täglich 500 mg/kg per os (Thyreo-Mack; 1 Tablette = 0,1 g *glandula thyreoidea sicca*, entsprechend 0,5 g frischer Schilddrüse) bzw. Thyroxin 8 Tage täglich 2,5 mg/kg subkutan.

Der Entzündungsversuch erfolgte 24 h nach der letzten Substanzverabreichung.

Ergebnisse. In der Tabelle sind die Resultate der Ödemmessung zusammengestellt.

Die antiphlogistische Wirkungsintensität von 200 mg/kg Phenylbutazon subkutan an der Formalin-arthritis der Ratte erfährt keine Abnahme durch Numalnarkose (DOMENJOZ *et al.*<sup>1</sup>) oder mehrtägige Vorbehandlung der

<sup>1</sup> R. DOMENJOZ, K. MÖRSDORF, E. G. STENGER und W. THEOBALD, Arch. exp. Path. Pharmak. 230, 325 (1957).

Tiere mit Schilddrüsenextrakt (69% Hemmung) bzw. Thyroxin (65% Hemmung). Der anti-inflammatorische Wirkungsgrad des Pharmakons wird hingegen bei den mit Schilddrüsenextrakt bzw. Thyroxin vorbehandelten Tieren durch Numalnarkose im Vergleich zu vorbehandelten, wachen Ratten um 50 bzw. 100% reduziert. Unter den dargelegten Versuchsbedingungen blockiert somit die Numalnarkose einen Prozess, der zur Entfaltung der ödemhemmenden Eigenschaften des Phenylbutazons erforderlich ist.

E. G. STENGER

*Pharmakologisches Institut der Universität des Saarlandes, Homburg, 19. September 1958.*

#### Summary

Following pretreatment of rats by thyroid extract or thyroxin, the anti-inflammatory action of phenylbutazone on formalin edema of the rat paw was strongly diminished by simultaneous numal anaesthesia of the animals.

### Experimenteller Beitrag zur Frage der Klärfaktoraktivierung

Die chemische Natur des Postheparinklärfaktors ist unbekannt, ebenso der Mechanismus der Klärfaktoraktivierung durch Heparin und Heparinoide. Die Frage, ob Heparin einen integrierenden Bestandteil des Klärfaktormoleküls darstelle, wurde immer wieder diskutiert. Heparin könnte in diesem Falle als ein Co-Ferment aufgefasst werden. Nachdem es gelungen war, aus Gewebe ohne jeden Heparinzusatz ein Enzym zu isolieren, das offenbar sehr weitgehend die biochemischen Eigenschaften des Postheparinklärfaktors aufwies, schien es zunächst wahrscheinlicher, dass das Heparin nur eine Ausschüttung des aktiven Fermentes aus der Zelle in die Blutbahn bewirkt (KORN<sup>1</sup>, ISELIN und SCHULER<sup>2</sup>). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese aus Gewebe isolierte Lipoproteinlipase durch Inkubation mit einer Heparinase inaktiviert wird (KORN<sup>3,4</sup>). Dies sprach wiederum für die gegenteilige Annahme, dass nämlich Heparin einen integrierenden Bestandteil des Enzyms darstelle.

Wir haben versucht, den Heparinoidgehalt eines gereinigten Klärfaktorpräparates unter Verwendung eines mit <sup>35</sup>S markierten Heparinoids<sup>5</sup> als Klärfaktoraktivator zu bestimmen. Als Heparinoid wurde der von STUDER *et al.*<sup>6</sup> beschriebene N-Formyl-chitosanpolyschwefelsäureester [Ro 1-8307/13] verwendet mit einer Radioaktivität von ungefähr 4  $\mu$ C pro mg. Dieses Heparinoid wurde einem Kaninchen in der Dosis von 8 mg/kg intravenös injiziert. 30 min später wurde das Versuchstier getötet und sein Plasma zur Gewinnung eines gereinigten Klärfaktorpräparates wie folgt aufgearbeitet: Adsorption des Enzyms durch Calciumphosphat (0,15 ml einer 0,2 molaren Suspension pro ml Plasma) während 30 min Waschen des Calciumphosphats mit Oxalatlösung. Elution des Klärfaktors mit 1,8%iger Natriumcitratlösung. Ausfällung des Klärfaktors aus dieser Natriumcitratlösung durch Verdünnen auf das 15fache Volumen mit CO<sub>2</sub>-gesättigtem Wasser.

<sup>1</sup> E. D. KORN, J. biol. Chem. 215, 1 (1955).

<sup>2</sup> B. ISELIN und W. SCHULER, Helv. physiol. Acta 15, 14 (1957).

<sup>3</sup> E. D. KORN, Science 124, 489 (1956).

<sup>4</sup> E. D. KORN, J. biol. Chem. 226, 827 (1957).

<sup>5</sup> In unseren chemischen Laboratorien hergestellt von Herrn Dr. J. WÜRSCH.

<sup>6</sup> A. STUDER, F. KOLLER, P. KAEGLI, K. VOGLER, W. OBERHÄNSLI und M. KOFLE, Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss. 13, 239 (1957).

Wiederauflösen des Präzipitats in physiologischer Kochsalzlösung. Das ganze Procedere wurde bei einer Temperatur von  $2^{\circ} \pm 1^{\circ}C$  durchgeführt. Die Testung des so gewonnenen Präparates auf Lipoproteinlipaseaktivität geschah an einem Substrat folgender Zusammensetzung: 0,04% Sesamöl (+ Emulgator und Konservierungsmittel), 10% Rinderserum, physiologische Kochsalzlösung ad 100%.

Die Zunahme der Lichtdurchlässigkeit einer Mischung dieses Substrats mit dem Testpräparat innert 2 h bei Inkubation bei 37°C diente als Indikator für die Klärfaktoraktivität. Die quantitative Bestimmung der Lipoproteinlipaseaktivität ist besonders für gereinigte Präparate vorläufig ein ungelöstes Problem. Immerhin erlaubt die Methode die Aussage, dass das gereinigte Präparat ungefähr 50% der Aktivität des verarbeiteten Plasmas aufwies.

Der Gehalt dieses Präparates und des verarbeiteten Plasmas an markiertem Heparinoid wurde durch Veraschung des Klärfaktorpräparates, bzw. des Plasmas mit Kaliumpermanganat, Kaliumhydroxid und Salzsäure unter Zusatz von Trägersulfat in Form von Schwefelsäure, nachfolgender Ausfällung als Bariumsulfat und Messung der Radioaktivität im «Flowcounter» (Tracerlab) bestimmt.

Ferner wurde der Proteingehalt des verarbeiteten Plasmas und des gewonnenen Klärfaktorpräparates kolorimetrisch nach der Methode von GLEISS und HINSBERG<sup>7</sup> bestimmt, die auf der Biuret-Reaktion beruht.

Werden die Werte für das verarbeitete Plasma = 100% gesetzt, so ergibt sich für das Klärfaktorpräparat ein Eiweissgehalt von 0,06% und eine Radioaktivität von 2,65%.

Durch analoge Ermittlung der Radioaktivität einer Heparinoidlösung bekannter Konzentration konnte für das Klärfaktorpräparat ein absoluter Heparinoidgehalt von 0,8  $\mu$ /ml errechnet werden.

Während somit der Eiweissgehalt beim Reinigungsvorgang um etwa das 1700fache gesenkt wurde (was bei dem beschriebenen Vorgehen wohl nur ausnahmsweise gelingt), betrug der Abfall der Heparinoidkonzentration nur ungefähr das 40fache. Aus diesen Daten muss geschlossen werden, dass der Heparinoidgehalt des Enzyms etwa 40mal grösser ist als der durchschnittliche Heparinoidgehalt der Gesamt-Plasmaeiweisse.-Diese Beobachtung stützt die Vermutung, dass das Heparinoid (bzw. Heparin) nach intravenöser Zufuhr zu einem integrierenden Bestandteil des Enzymmoleküls wird.

Unter der Annahme, dass der Gesamteiweissgehalt des verarbeiteten Plasmas ungefähr 6 g% betrug, resultiert ein absoluter Eiweissgehalt von etwa 35  $\mu$ /ml gereinigtes Klärfaktorpräparat. Das Molekulargewicht des Heparinoids kann mit ungefähr 5000 eingesetzt werden. Daraus ergibt sich, dass auf 1 Molekül Heparinoid immer noch mehrere Moleküle Eiweiss entfallen.

Als Arbeitshypothese könnte angenommen werden, dass sich zwischen den verschiedenen Plasmaeiweissfraktionen und dem Heparinoid ein Adsorptionsgleichgewicht einstellt. Die vom Apo-Ferment beanspruchte absolute Heparinoidmenge bleibt dabei – trotz der etwa 40fachen grösseren Affinität – klein infolge der geringen absoluten Menge von vorhandenem Apo-Ferment.

K. REBER und A. STUDER

*Abteilung für experimentelle Medizin der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel, 24. Juli 1958.*

<sup>7</sup> J. GLEISS und K. HINSBERG, Z. exp. Med. 116, 599 (1951).