



Free electrophoresis of rat liver proteins extracted after intraperitoneal injection of 1 mg/kg LSD. Extraction in phosphate Na buffer, pH 7.2, i.s. 0.1. Migration through 10 100 sec in Na-veronal/Na acetate, pH 8.6, i.s. 0.1. The following protein patterns are from animals killed 0, 10, 30, 45, 90, 180, 1080, and 1440 min respectively after the pharmacological treatment.

The phenomenon, completely reversible within 24 h, is most probably connected with what KEUP¹ said on the incorporation of labelled LSD into liver proteins. Another correlation might also be supposed: the one between hepatic lesion and central phenomena induced by LSD, according to the schema previously described by BLOCH et al.² as regards the mechanism of action of trimethyl-oxypheylethylamine.

What we should like to stress particularly are the following points:

1. The effect of LSD on the liver would not appear to be strictly specific, as it is reproduced also by 2-bromodiethylamide LSD.

2. The change appears whenever the drug is administered and, though the repetition of doses makes it decrease, such decrease never reaches the degree observable for central responses.

3. The chronological development of the biological phenomenon (Fig.) corresponds to the results obtained concerning the drug distribution in the metabolism³⁻⁵ and to those of KEUP on the incorporation of labelled LSD into the liver proteins; all such data show that the liver concentration starts almost immediately after intraperitoneal or intravenous injection and reaches its maximum within 2-4 h.

Riassunto. Mediante elettroforesi in fase libera è stato studiato il protidogramma epatico durante l'intossicazione con dietilamide dell'acido lisergico (LSD) nel ratto albino.

Si sono osservate profonde modificazioni del quadro le quali sono completamente reversibili.

G. MISSERE, G. TONINI and M. BABBINI

Istituto di Farmacologia della Università di Bologna (Italy), August 27, 1960.

¹ W. KEUP, *Neuropsychopharmacology* (Ed. by BRADLEY, DENIKER, RADOUCO-THOMAS, Elsevier, Amsterdam 1959).

² W. BLOCH, K. BLOCH, and B. PATZIG, *Z. physiol. Chem.* 290, 160 290 (1952); 291, 119 (1952).

³ E. S. BOYD, E. ROTHLIN, J. F. BONNER, I. H. SLATER, and H. C. HODGE, *J. Nervous Mental Dis.* 122, 470 (1955).

⁴ U. LANZ, A. CERLETTI, and E. ROTHLIN, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 13, 207 (1955).

⁵ A. STOLL, E. ROTHLIN, J. RUTSCHMANN, and W. R. SCHALCH, *Exper.* 11, 396 (1955).

Beitrag zur *in vitro*-Wirkung eines Thiapyron-derivates auf die Tributyrin und Acetylcholin spaltenden Fermente des Rattenserums

In einer Reihe von Arbeiten über die Aktivität der Cholinesterasen sind mehrere Hemmstoffe identifiziert worden, die besonderes pharmakologisches Interesse beanspruchen. Zu ihnen zählen beispielsweise Eserin und Physostigmin¹⁻³, Tri-*o*-kresylphosphat und Morphin⁴, einige Cucarepräparate⁵, Diisopropylfluorophosphat⁶, Parathion u. a.

In Stoffwechselfersuchen, die wir in unserem Institut mit einigen Thiapyronderivaten durchführten⁷, konnte die Feststellung gemacht werden, dass diese Verbindungen interessante aktivierende Eigenschaften besitzen. Diese Tatsache veranlasste uns, den Einfluss eines in dieser Beziehung besonders aktiven Thiapyronderivates auf die Spaltfähigkeit von Rattenserum für Acetylcholin und Tributyrin zu untersuchen.

Methodik. Die Versuche wurden an (♀) Wistar-Ratten in einer Gewichtsklasse von 150-200 g durchgeführt. Die Tiere wurden mit einem im VEB «Küssnerwerk» hergestellten Nährkonzentrat ernährt. Als Testsubstanz benutzten wir das 3-Benzyl-4-hydroxy-5-carbäthoxy-6-methylthiapyron^{1,8}, die wir als A₁ bezeichneten. Die Bestimmung der Fermentaktivität erfolgte auf manometrischem Wege. In allen Fällen dienten Leeransätze zur Ermittlung der Spontanhydrolyse des Substrates bzw. der ohne Gegenwart von Substrat aus dem Puffer in Freiheit gesetzten CO₂-Menge. Die Reaktion verläuft bei geeigneter Temperatur von 38°C und in Ringerlösung R₃₀. Das Substrat wurde als 2%ige Tributyrinlösung bzw. 1%ige Acetylcholinlösung (0,2 ml Tributyrin ad 10 ml R₃₀, 100 mg Acetylcholin ad 10 ml R₃₀) in einer Menge von 1,5 ml/Ansatz eingesetzt. Als Enzym verwendeten wir 0,5 ml einer 15%igen Serumverdünnung, die in den Seitenarm des Warburg-Gefäßes einpipettiert wurde. Die Prüfsubstanz wurde in R₃₀ zugegeben.

Diskussion. Aus den tabellarisch dargestellten Befunden ist ersichtlich, dass das untersuchte Thiapyronderivat die fermentative Hydrolyse von Tributyrin zu hemmen vermag. Da eine relativ grosse Anzahl von Autoren bislang

¹ K. B. AUGUSTINSSON und D. NACHMANSOHN, *J. biol. Chem.* 179, 543 (1949).

² R. D. HARKINS und B. MENDEL, *J. cell. comp. Physiol.* 27, 69 (1946).

³ D. NACHMANSOHN, M. A. ROTHENBERG und E. A. FELD, *J. biol. Chem.* 174, 247 (1948).

⁴ D. H. ADAMS und R. H. S. THOMPSON, *Biochem. J.* 42, 170 (1948).

⁵ M. M. HARRIS und R. S. HARRIS, *Proc. Soc. exp. Biol. Med., N.Y.* 56, 223 (1944).

⁶ R. D. HARKINS und B. MENDEL, *Brit. J. Pharmacol.* 2, 73 (1947).

⁷ T. KUSCH, *Acta biol. med. german.*, im Druck.

⁸ Diese Substanz wurde uns freundlicherweise von F. K. SPLINTER aus unserem Institut zur Verfügung gestellt. Sie wurde erstmalig von K. HEIDENBLUTH synthetisiert.

Der Einfluss eines Thiapyronderivates auf die Spaltfähigkeit des Rattenserums für Tributyrin und Acetylcholin^a

Testsubstanz	Substrat	$\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$	Hemmung (%)
Kontrolle	Tributyrin	144,0	30%
A ₁ ^b	Tributyrin	100,0	
Kontrolle	Acetylcholin	158,0	0%
A ₁	Acetylcholin	153,4	
Coffein ^c	Acetylcholin	160,0	0%

^a Die Prüfsubstanz wurde in einer Endkonzentration von $2,1 \times 10^{-3} M$ /Ansatz zugesetzt.
^b Die Befunde wurden auf Signifikanz im *t*-Test geprüft.
^c Das Coffein wurde in einer Endkonzentration von $4 \times 10^{-2} M$ /Ansatz zugesetzt.

annimmt, dass die Spaltfähigkeit des Serums für Acetylcholin und Tributyrin von einem einzigen Ferment (Pseudocholinesterase) bewirkt wird, stellten wir ergänzend Versuche mit Acetylcholin als Substrat an, in der Erwartung auch in diesem Falle eine Hemmung nachweisen zu können. Diese Vermutung konnte jedoch experimentell nicht bestätigt werden. Auf Grund der Hemmversuche gelangen wir zu der Annahme, dass sowohl das Tributyrin als auch das Acetylcholin im Rattenserum von zwei verschiedenen Esterasen hydrolysiert wird. Die Tributyrinase scheint ein mässig spezifisches Enzym zu sein, das demzufolge mit dem Begriff «Pseudocholinesterase» nicht mehr in Einklang gebracht werden kann. PILZ konnte in seinen Studien zur vermeintlichen Identität der Acetylcholin und Tributyrin spaltenden Fermente des menschlichen Serums zur gleichen Schlussfolgerung gelangen⁹. Ob dies auch für andere in der Pharmakologie gebräuchliche Tierarten zutrifft, kann noch nicht absolut entschieden werden.

Aus diesen Befunden ergibt sich zwangsläufig die Frage – die auch von mehreren Autoren älterer und jüngerer Zeit gestellt und im wesentlichen negativ beantwortet wurde – ob die im Serum nachweisbare Acetylcholin spaltende Esterase mit der Acetylcholinesterase der Erythrocyten und des Nervengewebes identisch ist. Wie aus den neusten Befunden von PILZ hervorgeht, soll beim Menschen die Acetylcholinesterase und die Serumcholinesterase ein einziges Ferment bilden, das nur Acetylcholin spaltet. Bekanntlich wird die Acetylcholinesterase u. a. durch Coffein selektiv gehemmt¹⁰. Auf die unspezifische Cholinesterase soll dieser Stoff keinen Einfluss ausüben. In unseren Versuchen mit Rattenserum konnten wir in Gegenwart von Coffein als Hemmstoff und mit Acetylcholin als Substrat keine signifikanten Unterschiede nachweisen.

Schlussfolgerung. 1. In einem Thiapyronderivat konnte ein neuer Tributyrinase-Hemmer entdeckt werden.

2. Das untersuchte Thiapyronderivat vermag im Sinne einer Hemmung nur die Spaltfähigkeit des Rattenserums für Tributyrin zu beeinflussen, nicht aber die für Acetylcholin, was der bisherigen Auffassung über die Existenz einer einzigen sogenannten «Pseudocholinesterase» widerspricht.

3. Die im Rattenserum nachweisbare Acetylcholin spaltende Esterase kann jedoch mit der in den Erythrocyten und im Nervensystem vorhandenen spezifischen Cholinesterase nicht absolut identifiziert werden, da das erstgenannte Ferment auf Coffein nicht anspricht.

Summary. A new tributyrinase-inhibitor could be found in a thiapyronderivate (3-benzyl-4-hydroxy-5-carbaethoxy-6-methylthiapyrone²). The splitting of acetylcholine is neither positively nor negatively influenced by this substance. The result is that the pseudocholinesterase, found in the serum of rats, represents no uniform system of enzymes.

T. KUSCH

Institut für Pharmakologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Deutschland), 22. September 1960.

⁹ W. PILZ, Z. ges. exp. Med. 132, 310 (1959).

¹⁰ E. A. ZELLER und A. BISSEGER, Helv. chim. Acta 26, 1619 (1943).

PRO EXPERIMENTIS

An Inexpensive, very Accurate Automatic Syringe

Syringes are widely used to transfer sensitive liquids such as, for example, Grignard reagents, because the small needle opening makes it unnecessary to take precautions to exclude air. It is equally obvious that a positive displacement apparatus is not affected by the viscosity or surface tension of the liquid being transferred. A single calibration of a syringe with one liquid provides for delivering identical volumes of all liquids including very viscous ones. Transferring viscous liquids with pipettes is extremely difficult and very inaccurate. It is generally not appreciated, however, that syringes can be used with greater convenience and accuracy than can automatic pipettes. For example, pipettes give, at best, an accuracy of $\pm 0.1\%$ whereas with this simple device, accuracies range from ± 0.01 to $\pm 0.06\%$. The sampling and transferring usually require about 20 sec.

The apparatus consists of a syringe and fitting plastic collar¹ shown in the Figure. A rod is drilled 0.0001 to 0.0002 inches larger than the syringe piston, machined to length, making sure that the ends are parallel, and one side machined or sawed away in order that the collar will slip easily onto the syringe piston.

Technique. Approximately 10% excess liquid is drawn into the syringe. The collar is placed on the syringe piston and, with the needle held upward, the syringe is tapped lightly to dislodge bubbles and the piston driven against the collar with the thumb. Any liquid which has wet the needle or syringe is wiped off. The syringe is emptied by maintaining a positive pressure on the piston with the thumb, and removing the collar with a rapid transverse motion. The pressure is maintained to drive the piston home. It is preferable to avoid using lubricants other than the transferred liquid. Typical results are shown in the following Table.

Zusammenfassung. Es wird ein einfacher Apparat beschrieben, der eine normale Spritze in eine genaue automatische Pipette umändert.

¹ The plastic should machine easily, wear well, and not be affected by solvents. Bakelite or similar resins are ideal.

² Present address: Converse Memorial Laboratory, Harvard University, Cambridge.