

Rohr auf 330° erhitzt. Die ätherische Lösung des Dehydrierungsproduktes fluoresziert grün. Die erhaltenen 260 mg rohes Öl wurden zweimal über Natrium destilliert. Sdp. ca. 110° (12 mm).

3,730 mg Subst. gaben 12,229 mg CO<sub>2</sub> und 3,417 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>13</sub>H<sub>18</sub> Ber. C 89,59 H 10,41%

Gef. „ 89,47 „ 10,25%

Beim Versetzen der alkoholischen Lösung des Kohlenwasserstoffs mit alkoholischer Pikrinsäure- oder Trinitro-benzol-Lösung konnte eine geringfügige Farbvertiefung festgestellt werden. Beim vorsichtigen Einengen der alkoholischen Lösungen wurden reine Pikrinsäure und Trinitro-benzol isoliert.

Oxydation des mit Palladium dehydrierten Kohlenwasserstoffs. Nach der Vorschrift von *Ruzicka* und *Seidel*<sup>1)</sup> wurden 320 mg Substanz mit 3,2 g Kaliumpermanganat und 2 cm<sup>3</sup> 10-proz. Natronlauge in 300 cm<sup>3</sup> Wasser 6 Stunden am Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten wurde der ausgeschiedene Braunstein mit schwefliger Säure gelöst, die Lösung mit Schwefelsäure angesäuert, mit Ammoniumsulfat gesättigt und mit Äther ausgezogen. Beim Eindampfen der Ätherlösung wurden 140 mg braunes Öl erhalten, das auf Zusatz von Sodalösung nicht gelöst wurde. Die schwefelsaure Lösung wurde 14 Stunden mit Äther extrahiert. Es wurden Spuren eines amorphen Produktes erhalten, das unscharf bei 180–200° schmolz.

Dehydrierung mit Selen bei 410°. 500 mg des Umsetzungsproduktes mit Methyl-magnesiumjodid wurden im evakuierten Rohr mit 1 g Selen 16 Stunden auf 410° erhitzt. Der dunkel gefärbte Rohrinhalt wurde mit Äther herausgespült und durch eine kurze Schicht Aluminiumoxyd-Aktivkohle filtriert. Die erhaltenen 210 mg Öl wurden destilliert und gaben dann mit alkoholischer Trinitro-benzol-Lösung nur eine schwache Farbvertiefung. Beim Einengen der Lösung fiel Trinitro-benzol aus.

Die Mikroanalysen wurden von den Herren *H. Gubser* und *W. Manser* ausgeführt.

Organisch-chemisches Laboratorium der  
Eidg. Techn. Hochschule Zürich.

## 18. Über die Spezifität der Cholin-esterase-Hemmung durch Tri-o-kresyl-phosphat

von *A. Hottinger* und *Hubert Bloch*.

(17. XII. 42.)

In früheren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Tri-o-kresyl-phosphat (o-Tr) die Fähigkeit besitzt, in vitro die Aktivität der Cholin-esterase (ChE) zu hemmen<sup>2)</sup>. Da noch sehr geringe Mengen von o-Tr diese Fermenthemmung auszuüben vermögen, wurde die Vermutung ausgesprochen, dass diese Eigenschaft von o-Tr im Zusammenhang stehe mit dessen pharmakodynamischer Wirkung. Zur weiteren Abklärung der Frage musste daher zunächst geprüft werden, ob der beschriebene in vitro-Effekt auch am vergifteten Ganztier zu beobachten sei, denn nur wenn dies der Fall

<sup>1)</sup> Helv. 19, 424 (1936).

<sup>2)</sup> *H. Bloch*, Helv. Med. Acta 8, Suppl. VII, 15 (1941).

war, konnte die Möglichkeit, dass das Fermentsystem der ChE am Wirkungsmechanismus des o-Tr mitbeteiligt sei, überhaupt weiterdiskutiert werden.

Als Versuchstiere verwendeten wir Kaninchen, die sich uns bereits in andern Untersuchungen über die Wirkung von o-Tr als geeignet erwiesen hatten<sup>1)</sup>. Da wir jedoch in unsern ersten Versuchen, in denen wir die Hemmung der ChE-Aktivität durch o-Tr festgestellt haben, als Fermentpräparation Pferdeserum benützten, musste zuerst festgestellt werden, ob auch die ChE aus Kaninchenorganen unter der Einwirkung von o-Tr gleichermassen gehemmt wird, was nicht von vorneherein selbstverständlich ist. Vielmehr ist bekannt, dass ein und dieselbe Substanz die ChE aus verschiedenen tierischen Organen ganz verschieden stark hemmen kann<sup>2)</sup>. Wir prüften deshalb die Wirkung von o-Tr auf die ChE des Kaninchen-serums, der Kaninchenleber, des Kaninchengehirns, des Menschen-serums, der Menschenleber und des Menschengehirns. Die Bestimmung der ChE-Aktivität erfolgte nach der Methode von Ammon<sup>3)</sup> im Warburg-Apparat.

Im Hauptgefäß 1,5 cm<sup>3</sup> einer 0,5-proz. Lösung von Acetyl-cholin-chlorid „Roche“<sup>4)</sup>; im Anhang 0,5 cm<sup>3</sup> des Organextraktes, bzw. Serums, in der jeweils angegebenen Verdünnung, die sich stets auf das Gesamtvolumen  $v_F = 2$  cm<sup>3</sup> bezieht. Verdünnungsflüssigkeit: Hydrogencarbonat-Ringer-Lösung nach Krebs. Versuchstemperatur: 37,3°. Die Extrakte wurden aus frisch entnommenen Organen bereitet. Extraktionsflüssigkeit: Ringer-Lösung oder Glycerin. Bezüglich weiterer methodischer Einzelheiten s. Bloch<sup>5)</sup>.

Die Versuche sind in Tabelle I zusammengestellt. Wir geben hier nur die Endwerte nach 60 Minuten wieder. Die Ablesungen erfolgten jedoch in Zwischenräumen von 10 bzw. 15 Minuten und ergaben stets einen linearen Spaltungsverlauf.

Es zeigte sich nun, wie dies aus Tabelle I ersichtlich ist, dass die ChE verschiedener Provenienz durch o-Tr auch ganz verschieden stark gehemmt wird, womit die Angaben von Zeller<sup>6)</sup> bestätigt und erweitert werden können.

Ganz allgemein kann gesagt werden, dass die ChE des Serums vollständiger gehemmt wird als das Ferment aus Gehirn oder Leber. Da jedoch in allen diesen Versuchen keine gereinigten Fermentpräparate geprüft wurden, sondern stets nur Organextrakte, die das untersuchte Ferment neben vielen andern enthielten, wissen wir nicht, ob diese festgestellten Unterschiede eine tatsächliche Eigenheit der Fermente der betreffenden Provenienz darstellen, oder ob

<sup>1)</sup> H. Bloch und A. Hottinger, Z. Vitaminforsch. (im Druck).

<sup>2)</sup> E. A. Zeller, Helv. **25**, 1099 (1942).

<sup>3)</sup> P. Ammon, Pflüger's Archiv **233**, 486 (1933).

<sup>4)</sup> Der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G. in Basel danken wir für die Überlassung der nötigen Mengen von Acetyl-cholin sowie von Prostigmin.

<sup>5)</sup> H. Bloch, Helv. **25**, 793 (1942).

<sup>6)</sup> E. A. Zeller, Helv. **25**, 1099 (1942).

sie lediglich auf der Beimengung fremder Substanzen beruhen, die den Ablauf der Fermentwirkung störend beeinflussen. Auffällig ist jedoch, dass die ChE aus menschlichen Organen durch o-Tr durchwegs stärker gehemmt wird als das Ferment der Kaninchenorgane.

Tabelle I.

Hemmung von ChE verschiedener Provenienz durch o-Tr.

ChE aus	Zusatz von	mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> <sup>1)</sup> in 60 Min.	% Hemmung
Menschenserum 1 : 60	—	168	—
„	1,0 mg o-Tr	6	96,5
„	0,2 mg o-Tr	111	34
„	0,04 mg o-Tr	143	15
„	0,04 mg Prost.	4	97,5
Menschengehirn 1 : 25	—	32	—
„	1,0 mg o-Tr	5	84,5
„	0,2 mg o-Tr	10	69
„	0,04 mg o-Tr	24	25
„	0,04 mg Prost.	8	75
Menschenleber 1 : 25	—	70	—
„	1,0 mg o-Tr	18	74
„	0,2 mg o-Tr	32	54
„	0,04 mg o-Tr	52	26
„	0,04 mg Prost.	11	84
Kaninchenserum 1 : 30	—	68	—
„	1,0 mg o-Tr	31	54
„	0,2 mg o-Tr	50	27
„	0,04 mg o-Tr	54	21
„	0,04 mg Prost.	2	97
Kaninchengehirn 1 : 25	—	228	—
„	1,0 mg o-Tr	122	46
„	0,2 mg o-Tr	158	31
„	0,04 mg o-Tr	179	21
„	0,04 mg Prost.	0	100
Kaninchenleber 1 : 25	—	218	—
„	1,0 mg o-Tr	183	16
„	0,2 mg o-Tr	184	16
„	0,04 mg o-Tr	188	14
„	0,04 mg Prost.	29	87

Es bleibe vorerst dahingestellt, ob diese Erscheinung im Zusammenhang steht mit der Tatsache, dass o-Tr für das Kaninchen anscheinend weniger toxisch ist als für den Menschen, und dass der Wirkungsmechanismus des Giftes beim Kaninchen auch ein anderer zu sein scheint. Zum Vergleich wurde in diesen Versuchen stets noch

<sup>1)</sup> Die Leerwerte (Spontanhydrolyse des Acetyl-cholins) sind von diesen Werten abgezogen. Sie betrugen durchschnittlich 5—10 mm<sup>3</sup> pro Stunde.

die Hemmung der ChE durch Prostigmin (Carbaminsäure-ester des 3-Oxy-phenyl-trimethylammonium-methylsulfats), welches als spezifischer Inhibitor der Aktivität dieses Fermentes gilt, gemessen, und es zeigte sich, dass die Wirkung von o-Tr eine durchschnittlich 5—25mal schwächere war als diejenige des Prostigmins. In Anbetracht der Tatsache aber, dass Prostigmin sehr gut wasserlöslich ist, während sich o-Tr in Wasser praktisch nicht löst, möchten wir auf dieses Zahlenverhältnis kein grosses Gewicht legen. Denn es ist anzunehmen, dass in der wässrigen Versuchslösung, in der das o-Tr als Emulsion vorhanden war, nur die in den Lipoiden des Serums gelösten Anteile zur Wirkung gelangen konnten, was aber nur einen sehr geringen Bruchteil der eingewogenen Menge ausmacht. Demzufolge wäre die effektive inhibitorische Kraft von o-Tr gegenüber der ChE bedeutend höher als dies aus den gemessenen Werten hervorgeht. Eine Bestätigung für diese Vermutung lieferten denn auch die Tierversuche, über die im folgenden berichtet wird.

Denn es interessierte nun zu prüfen, ob die *in vitro* nachweisbare Hemmung der Aktivität der ChE auch beim vergifteten Tier zu beobachten sei. Zu diesem Zweck wurde die Substanz Kaninchen in einer Dosierung von 0,18 g/Kg verfüttert und die Aktivität der Serum-ChE in regelmässigen Abständen bestimmt, nachdem zuvor an mehreren aufeinander folgenden Tagen die Normalwerte bzw. die physiologischen Schwankungen dieser Werte ermittelt worden waren. Die Ergebnisse eines solchen Versuchs sind in Fig. 1 dargestellt.

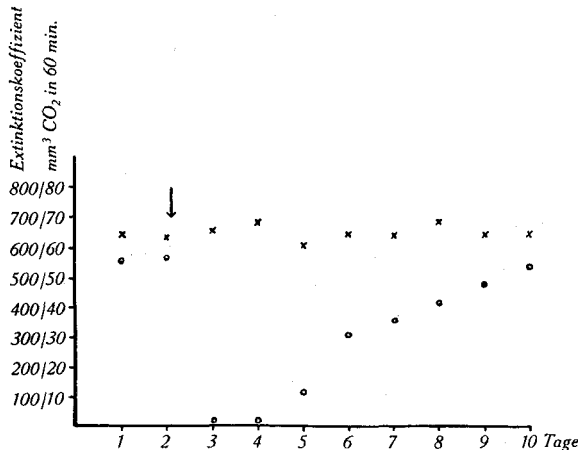


Fig. 1.

Das Verhalten der ChE (o)- und der Serum-phosphatase (x)-Aktivität unter der Einwirkung von o-Tr. Beim Pfeil wurden dem Kaninchen (Kontr.-Nr. 15) 0,18 g/kg o-Tr. verfüttert.

Aus dieser Figur, die einen von zahlreichen, absolut gleichartig verlaufenen Versuchen wiedergibt, geht hervor, dass bei Kaninchen

schon längstens 24 Stunden nach der Verfütterung einer nicht tödlichen Dosis von o-Tr<sup>1)</sup> im Serum keine Aktivität mehr nachweisbar ist. Das Ferment bleibt während mehreren Tagen vollständig blockiert und seine Aktivität kehrt erst im Verlauf von 1—2 Wochen langsam steigend wieder zur Norm zurück. Ebenso wie die Serum-ChE verhält sich auch die ChE aus blutfrei gespültem Gehirn und aus der Leber.

Es lässt sich nun vorerst allerdings nicht entscheiden, ob dieser Aktivitätsschwund darauf zurückzuführen ist, dass das Ferment durch o-Tr, welches im Blute kreist, blockiert wird, sodass der Mechanismus ein ähnlicher wäre wie beim in vitro Versuch, wo das Ferment und der Inhibitor erst unmittelbar vor Versuchsbeginn zusammengebracht wurden, oder ob das o-Tr die Bildungsstätten des Ferments direkt angreift, sodass gar keine ChE mehr gebildet wird. Diese Frage stellt sich aber nicht nur beim o-Tr, sondern überhaupt bei jedem fermentativen Hemmstoff, und solange die Bildungsstätten der ChE nicht genauer bekannt sind, kann diese Frage auch nicht gültig beantwortet werden.

In unseren früheren Versuchen hatten wir gefunden, dass auch Tri-m-kresyl-phosphat in vitro denselben hemmenden Einfluss auf die Aktivität der ChE besitzt. Nun ist aber seit den Untersuchungen von Gross und Grosse<sup>2)</sup> bekannt, dass Tri-m-kresyl-phosphat selbst in hohen Dosen am lebenden Tier ohne pharmakologische Wirksamkeit ist, und in Bestätigung dieses Befundes konnten wir nachweisen, dass am lebenden Kaninchen diese Verbindung auch ohne jeden Einfluss auf die Aktivität der ChE ist, selbst wenn sie in zehnfach höherer Dosierung als o-Tr verfüttert wurde. Die Untersuchungen über die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und pharmakologischer Wirkung bei dieser Gruppe von Stoffen werden Gegenstand einer späteren Mitteilung sein.

Wenn die obenerwähnte Vermutung, dass die Wirksamkeit von o-Tr gegenüber der ChE-Aktivität insofern spezifisch sei, dass sie mit dem Wirkungsmechanismus des Giftes zusammenhänge, so musste ausgeschlossen werden können, dass die Substanz auch auf andere Fermentsysteme hemmend (oder aktivierend) einwirkt. Nur wenn dies nicht der Fall war, konnte man eine Spezifität der Wirkung in Betracht ziehen.

Es wurde deshalb der Einfluss von o-Tr auf die Aktivität verschiedener Fermente geprüft. Vollständig unbeeinflusst blieben:

---

<sup>1)</sup> Nähere Angaben über die Symptome der Vergiftung und über die Wirkung der angewandten Dosis s. b. H. Bloch und A. Hottinger<sup>3)</sup>.

<sup>2)</sup> E. Gross und A. Grosse, *Naunyn-Schmiedeberg's A.* **168**, 473 (1932).

<sup>3)</sup> H. Bloch und A. Hottinger, *Z. Vitaminforsch.* (im Druck).

Trypsin, Arginase, Histidase, Prothrombin, Thrombokinase und Thrombin<sup>1)</sup>.

Im Hinblick auf die von der ChE abweichende Natur dieser Fermente überraschten die negativen Befunde nicht. Umsomehr aber interessierte in diesem Zusammenhang das Verhalten von näher verwandten Fermenten, insbesondere von Esterasen.

Neben der ChE prüften wir zuerst bei der Serumphosphatase den Einfluss von o-Tr. Die Bestimmung erfolgte nach der Methode von *Bodansky*<sup>2)</sup>:

Zu 10 cm<sup>3</sup> Substratlösung (Natrium- $\beta$ -glycerophosphat in Glykokollpufferlösung vom  $p_H = 8,6$ ) wird 1 cm<sup>3</sup> Serum zugegeben und nach verschiedenen langen Bebrütungszeiten (Bruttemperatur: 37°) mit Trichloressigsäure gefällt, die Phosphor-Bestimmung im Filtrat vorgenommen und die P-Werte als Mass für die Tätigkeit der Phosphatase in der Zeiteinheit eingesetzt.

Es zeigte sich, dass o-Tr in vitro keinerlei Einfluss auf die Aktivität der Phosphatase besitzt, und zwar ist es gleichgültig, ob das o-Tr erst unmittelbar vor dem Versuch mit dem Serum zusammengebracht wird, oder ob die Mischung einige Zeit bei 37° inkubiert wurde und die Bestimmung erst hernach erfolgte.

Tabelle II.

nach Stunden	Erwachsenenserum			Kaninchenserum		
	inakt. Ser.	Ser. + 0,1 g o-Tr.	nat. Ser.	inakt. Ser.	Ser. + 0,1 g o-Tr.	nat. Ser.
1	460	507	505	472	507	512
4	456	571	595	501	602	613
5 ½	490	677	680	542	730	700
24	500	1015	1020	565	1205	1250

nach Stunden	Kinderserum			Kontrollen	
	inakt. Ser.	Ser. + 0,1 g o-Tr.	nat. Ser.	P + M	
1	515	595	623	349	348
4	498	842	828	350	353
5 ½	497	1005	987	347	350
24	505	1475	1510	350	350

Die Zahlen bedeuten den Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) der freigewordenen Phosphatmengen, bestimmt nach *Bell-Doisy*.

inakt. Ser. = Serum, das durch Erhitzen auf 65° während 10 Minuten inaktiviert wurde.

nat. Ser. = unverändertes, natives Serum.

P = Pufferlösung nach *Bodansky* ( $p_H = 8,6$ ).

M = Messlösung.

<sup>1)</sup> Wir danken auch an dieser Stelle Herrn Dr. G. Viollier (Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel) für die Ausführung der Arginase- und Histidasebestimmungen, sowie Herrn Dr. M. Guggenheim von der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G. in Basel für die Bestimmungen von Thrombin, Prothrombin und Thrombokinase.

<sup>2)</sup> A. Bodansky, J. Biol. Chem. (Am.) 101, 93 (1933).

In Tabelle II sind die Ergebnisse einer solchen Phosphatasebestimmung wiedergegeben; als Kontrolle verwendeten wir Serum von der gleichen Portion, das durch Erhitzen inaktiviert und dessen Phosphatase dadurch zerstört war.

Es geht aus der Tabelle hervor, dass o-Tr in vitro die Aktivität der Serum-Phosphatase nicht zu beeinflussen vermag, und zwar wurde die zugesetzte Menge o-Tr von 0,05 g bis zu 0,3 g variiert, ohne dass dadurch ein verändertes Verhalten der Phosphatase hätte beobachtet werden können. Alle Versuche verliefen gleichsinnig negativ.

Ebensowenig wie in vitro wird beim o-Tr-vergifteten Tier im Verlauf der Vergiftung die Serum-phosphatase verändert. In Fig. 1 sind die entsprechenden Werte eingetragen. Während zur gleichen Zeit bei diesem Kaninchen die ChE infolge der Einwirkung von o-Tr nicht mehr nachweisbar war und erst im Verlaufe von Tagen langsam wieder zur Norm zurückkehrte, blieben die Phosphatasewerte über die ganze Versuchsdauer konstant und unverändert.

Nachdem es sich so gezeigt hatte, dass die Serum-phosphatase trotz der Verwandtschaft mit der ChE durch o-Tr unbeeinflusst bleibt, prüften wir weitere Esterasen auf ihre Verhalten unter der Einwirkung von o-Tr, und zwar die Serum-lipase aus Menschen- und Kaninchenserum, die Leber-lipase aus Menschen- und Kaninchenleber und die Pankreas-lipase aus Schweineleber. Es handelt sich hier um Fermente, die sowohl bezüglich ihrer Herkunft als auch der Substrate, die sie hydrolysieren, voneinander abweichen. Zur Prüfung der Reaktionen der Serum-lipase wählten wir natives, frisch gewonnenes Kaninchen- und Menschenserum. Es zeigte sich, dass wohl quantitative individuelle Schwankungen von einem Tier zum andern bzw. von einem Menschen zum andern in bezug auf die absoluten Lipasewerte bestehen, dass aber das Verhältnis von gehemmter zu ungehemmter Serum-lipase konstant ist. — Leber-lipase wurde durch Glycerinextraktion einer fein zerkleinerten Kaninchenleber gewonnen, während die Pankreas-lipase nach der Methode von *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz*<sup>1)</sup> aus frischem Schweinepankreas dargestellt wurde.

Die Bestimmung erfolgte nach der Methode von *Rona* und *Lasnitzki*<sup>2)</sup> im *Warburg*-Apparat. Die Versuche sind in Tabelle III zusammengestellt.

Gleich wie in vitro verhält sich die Lipase auch beim Tier, welchem o-Tr in der üblichen Dosierung verfüttert wurde: Das Ferment ist schon kurze Zeit nach der Vergiftung weder im Serum noch in den Organen mehr nachweisbar und kehrt erst langsam steigend,

<sup>1)</sup> P. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz, *Hoppe-Seyler's Z.* **125**, 132 (1923).

<sup>2)</sup> P. Rona und A. Lasnitzki, *Bioch. Z.* **152**, 504 (1924).

ähnlich wie die ChE, wieder zur Norm zurück. Fig. 2 illustriert einen solchen Versuch.

**Tabelle III.**

Hemmung von verschiedenen Lipasen durch o-Tr.

Lipase aus	Substrat	Zusatz von	mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> in 60 Min.	% Hemmung
Menschen Serum 1 : 60	Tributyrin 0,75%	—	168	—
„	„	1,0 mg o-Tr	6	96,5
„	„	0,2 mg o-Tr	108	36
„	„	0,04 mg o-Tr	143	15
„	„	0,04 mg Prost.	52	69
Menschenleber 1 : 25	„	—	495	—
„	„	1,0 mg o-Tr	279	43,5
„	„	0,2 mg o-Tr	352	29
„	„	0,04 mg o-Tr	488	1,5
„	„	0,04 mg Prost.	414	16,5
Kaninchenserum 1 : 30	„	—	480	—
„	„	1,0 mg o-Tr	330	31
„	„	0,2 mg o-Tr	369	23
„	„	0,04 mg o-Tr	399	17
„	„	0,04 mg Prost.	106	78
Kaninchenleber 1 : 1400 <sup>1)</sup>	„	—	87	—
„	„	1,0 mg o-Tr	30	65,5
„	„	0,2 mg o-Tr	50	42,5
„	„	0,04 mg o-Tr	61	30
„	„	0,04 mg Prost.	56	35,5
Schweinepankreas 1 : 30	Olivöl 1%	—	37	—
„	„	1,0 mg o-Tr	37	0
„	„	0,2 mg o-Tr	36	0
„	„	0,04 mg o-Tr	37	0
„	„	0,04 mg Prost.	38	0

Diese Befunde erscheinen in verschiedener Hinsicht bemerkenswert. Nachdem die Serum-Phosphatase sich durch o-Tr überhaupt nicht hemmen liess, überraschte die vollständige Inhibition der Lipase aus Menschen Serum durch o-Tr. Aber auch bei diesem Ferment zeigte sich, ähnlich wie bei der ChE, eine quantitativ sehr unterschiedliche Hemmbarkeit (bei gleichbleibendem Substrat), je nach der Herkunft des Ferments. Wie bei der ChE, so ist auch bei der Lipase die aus dem Menschen Serum stammende Esterase bei weitem am stärksten gehemmt.

Um Fehler auszuschliessen, die methodisch bedingt sein könnten, prüften wir schliesslich noch in anderer Versuchsordnung den Ein-

<sup>1)</sup> Glycerinextrakt aus fein verriebener Kaninchenleber.



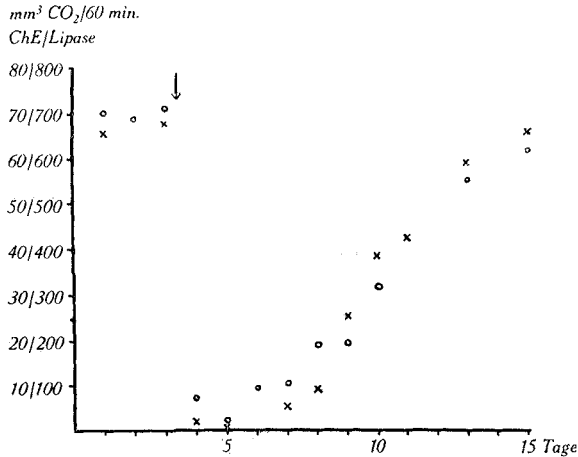


Fig. 2.

Das Verhalten von ChE und Serum-lipase nach o-Tr-Vergiftung. Kaninchen No. 24. o = ChE-Werte; x = Lipasewerte. Beim Pfeil wurden dem Tier 0,18 g/kg o-Tr. verfüttert.

fluss von o-Tr und Physostigmin auf eine andere Lipase anderer Provenienz, auf die Frauenmilch-lipase.

Methodik nach *Freudenberg*<sup>1)</sup>: 5 oder 10 cm<sup>3</sup> in der Zentrifuge abgerahmte Frauenmilch (FM) werden mit je 10 cm<sup>3</sup> frischer Kuhmilch vermischt. Als Aktivator werden wechselnde Mengen von glykocholsaurem Natrium beigegeben und die durch die Lipase-tätigkeit freiwerdenden, aus der Kuhmilch abgespaltenen, niedern Fettsäuren gegen Neutralrot mit 0,1-n. NaOH stündlich titriert. Die Werte, zu einem Gesamtwert addiert, ergeben die Tätigkeit der FM-Lipase.

In Tabelle IV ist ein solcher Versuch dargestellt; es geht daraus hervor, dass auch die Spaltung der im Kuhmilchfett enthaltenen Säuren durch FM-Lipase unter der Einwirkung von geringen Mengen von Physostigmin und o-Tr noch gehemmt wird. Da in dieser Versuchsanordnung sowohl Substrat als Lipase anderer Natur und Provenienz waren, kann der Versuch als Bestätigung und Erweiterung des mit der Serum-lipase erhobenen Befundes gelten.

Wie aus den Tabellen III und IV weiter hervorgeht, lassen sich die untersuchten Lipasen<sup>2)</sup> alle auch durch Physostigmin oder Prostigmin hemmen. Allerdings sind die zur Hemmung der Lipase benötigten Physostigmin- bzw. Prostigminkonzentrationen etwas höher als bei der ChE; aber das Hemmungsvermögen ist noch beträchtlich, und man wird, wenn es sich darum handelt, ein Ferment auf Grund seiner Hemmbarkeit durch Physostigmin oder Prostigmin als ChE zu identifizieren, vorsichtig sein und diesen relativ geringen quantitativen Unterschieden die nötige Aufmerksamkeit schenken müssen.

<sup>1)</sup> E. Freudenberg, Z. Kinderheilk. **43**, 437 (1927).

<sup>2)</sup> Mit Ausnahme des aus Schweinepankreas gewonnenen Ferments.

Tabelle IV.

Bebrütungs- zeit in Std.	Ansatz: 10 cm <sup>3</sup> Frauen-Magermilch + 10 cm <sup>3</sup> Kuh- Vollmilch + 20 mg glykocholsaures Natrium				
	kein Zusatz	Zusatz von Physostigmin			
		0,002 g	0,001 g	0,0001 g	0,00001 g
1	3,0	1,4	2,2	2,2	2,2
2	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
3	2,0	1,2	1,5	1,7	1,8
24	7,8	0,4	1,8	7,0	8,0
Total	14,8	5,0	5,5	12,9	13,0

Bebrütungs- zeit in Std.	Ansatz: 10 cm <sup>3</sup> Frauen-Magermilch + 10 cm <sup>3</sup> Kuh-Vollmilch + 20 mg glykochol- saures Natrium				Kuh- milch allein
	Zusatz von Tri-o-kresyl-phosphat				
	0,1 g	0,05 g	0,01 g	0,001 g	
1	2,0	2,2	2,2	2,2	0
2	2,0	2,0	2,0	2,0	0
3	1,8	1,8	1,8	2,0	0
24	1,5	1,8	5,0	7,0	0
Total	7,3	7,8	11,0	13,2	0

Die Zahlen bezeichnen die Anzahl cm<sup>3</sup> 0,1-n. NaOH, die zur Titration gegen Neutralrot verwendet wurden.

Aus dem in Fig. 2, S. 150, dargestellten Versuch geht nun aber auch hervor, dass das Verhalten der Lipase und der ChE eine direkte Proportionalität zu den übrigen Vergiftungssymptomen erkennen lässt: mit zunehmender Rückkehr der Fermentaktivität schwinden auch die übrigen Vergiftungserscheinungen, die, ebenso wie die Fermentblockierung, plötzlich und innert weniger Stunden eingesetzt haben. Bei demselben Kaninchen, von dem die Kurve stammt, konnten wir auch eine Parallelität zwischen dem Verlauf der Fermentaktivität und demjenigen der Kreatinausscheidung im Harn, die im Gefolge der Vergiftung auftritt, feststellen, Versuche, über die a. a. O. berichtet wurde<sup>1)</sup>. Erholt sich ein Kaninchen nicht mehr und geht an der Vergiftung zugrunde, so bleiben auch die Fermentwerte dauernd tief. In Fig. 3 ist ein solcher Fall dargestellt.

### Diskussion.

Nachdem der in vitro beobachtete Effekt der ChE-Hemmung durch o-Tr auch am lebenden, mit o-Tr vergifteten Tier bestätigt werden konnte, waren wir in unserer, schon anfänglich geäußerten Ansicht, dass diese Fermentblockierung mit dem Mechanismus der Vergiftung in einem ursächlichen Zusammenhang stehe, bestärkt.

<sup>1)</sup> H. Bloch und A. Hottinger, Z. Vitaminforsch. (im Druck).

Wir konnten zwischen der Dauer und dem Grad der Fermentblockierung und der Dauer und Schwere des klinischen Krankheitsbildes eine direkte Proportionalität feststellen. Bei zwei Kaninchen, die innert 10 bzw. 13 Tagen an der Vergiftung zugrunde gingen, die sich also nicht mehr erholten, blieben auch die Fermentwerte bis zum Tode niedrig. In der gleichen Zeitspanne entwickelte sich bei einem Versuchstier derselben Serie, das sich von der Vergiftung wieder erholte, auch die Fermentaktivität wieder zur Norm zurück (Fig. 3).

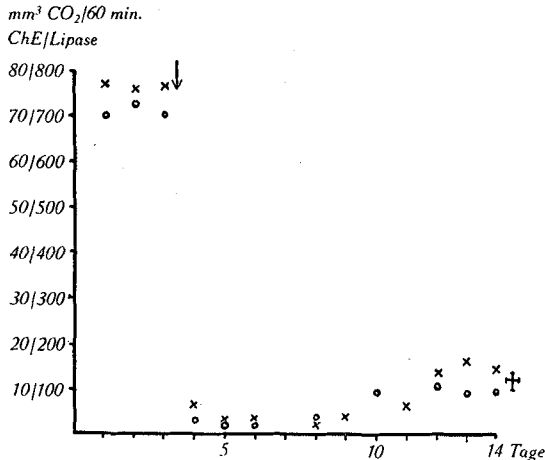


Fig. 3.

Das Verhalten von ChE (o) und Serum-lipase (x) bei tödlich verlaufender Vergiftung mit o-Tr. Kaninchen No. 17. Beim Pfeil wurden dem Tier 0,18 g/kg. o-Tr. verfüttert.

Dieser Deutung eines Kausalkonnexes zwischen Blockierung der ChE und dem Wirkungsmechanismus des o-Tr standen nun eine Reihe von Einwänden gegenüber. Zunächst musste die Spezifität der Wirkung von o-Tr auf die ChE erwiesen werden. Wenn andere Fermente ebenfalls gehemmt wurden, so war es zum mindesten zweifelhaft, ob diese Wirksamkeit auf die Fermente pathogenetisch von Bedeutung sei. Es wurde deshalb eine grössere Zahl von Fermenten in die Untersuchung miteinbezogen, und bei keinem konnte auch nur die geringste quantitative oder qualitative Aktivitätsveränderung unter der Einwirkung von o-Tr beobachtet werden — mit einer einzigen Ausnahme: der Serum-lipase. Hier waren noch so geringe Mengen von o-Tr wirksam wie bei der ChE, und auch beim vergifteten Tier war die Serum-lipase parallel zur ChE blockiert und ging dieser Aktivitätsschwund parallel den übrigen Vergiftungssymptomen. Nun konnte aber gezeigt werden, dass auch Prostigmin, das als spezifischer Inhibitor der ChE gilt, die Aktivität der Serum-lipase zu hemmen vermag. Genauere quantitative Vergleiche können aus den schon erörterten Gründen der verschiedenen Löslichkeits-

verhältnisse der beiden Inhibitoren o-Tr und Prostigmin bei der angewandten Bestimmungsmethodik nicht angestellt werden, hingegen waren von beiden Substanzen und in beiden Fällen noch sehr geringe Mengen stark wirksam. Dies spricht aber zweifellos für eine nahe Verwandtschaft der beiden Fermente und nicht ohne weiteres gegen die Annahme einer kausalen Auswirkung der ChE-Hemmung durch o-Tr im vergifteten Organismus. Gestützt wird diese Annahme auch durch die Tatsache, dass Pankreas-lipase, die im Gegensatz zur Serum-esterase als eigentliche Lipase echte Fettsäuren spaltet, weder durch o-Tr noch durch Prostigmin gehemmt wird (Tab. III).

Der zweite Einwand, der erhoben werden kann, ist der, dass die Hemmung von Fermenten des Serums untersucht worden war, dass sich aber die ChE der Organe ganz anders verhalten kann als diejenige des Serums. Darauf weist auch *Zeller*<sup>1)</sup> hin, wenn er betont, dass der gleiche Inhibitor auf dasselbe Ferment ganz verschieden einwirken kann, je nach der Tierart, von der das Ferment stammt und je nach dem Organ, aus dem es gewonnen wurde. Andererseits ist man eben methodisch gezwungen, sich auf die Untersuchung einzelner, spezieller Organextrakte zu beschränken, und es fällt schwer, anzunehmen, dass eine so vollkommene Blockierung der ChE im Serum, wie man sie bei der o-Tr-Vergiftung beobachtet, ohne jede biologische Auswirkung sein soll, auch wenn man die Bedeutung der Anwesenheit von ChE im Serum nicht kennt. Die einzige Funktion der ChE, welche man kennt, besteht im Abbau und wohl auch in der Synthese des für die neuro-muskuläre Reizübertragung verantwortlichen Acetyl-cholins. Der Ort der Wirksamkeit des Fermentes wäre demnach eng umschrieben: die motorische Nervenendplatte. Damit stimmt allerdings die Tatsache nicht recht überein, dass das Ferment an Orten nachgewiesen werden konnte, wo gar keine cholinergischen Nervenfasern sind, also in den verschiedensten Organen, in den roten Blutkörperchen, ja schliesslich auch bei Tieren, die überhaupt keine cholinergischen Nerven besitzen, bei Crustaceen, Mollusken und Echinodermen. — Man misst deshalb Befunden über Änderungen des ChE-Gehaltes des Blutes oder verschiedener Organe aus diesen Überlegungen heraus nur eine bedingte Bedeutung zu und konnte andererseits, z. B. beim Krankheitsbild der Myasthenia gravis, bei dem man ex iuvantibus, d. h. aus den guten Erfolgen der Prostigmin-Therapie, auf eine Anomalie im Verhalten der ChE schloss, nie mit Sicherheit eine Vermehrung dieses Fermentes im Blut nachweisen<sup>2)</sup>.

Ausserdem sind im Laufe der Zeit eine grosse Zahl von sehr verschiedenartigen Substanzen bekannt geworden, die alle trotz ganz verschiedener pharmakologischer Wirksamkeit die ChE zu hemmen

---

<sup>1)</sup> E. A. Zeller, Helv. **25**, 1099 (1942).

<sup>2)</sup> M. Guggenheim, Die biogenen Amine, 3. Aufl., Basel 1940.

vermögen und bei denen man sich oft die Bedeutung der Wirksamkeit auf die Aktivität der ChE nicht erklären kann. Bei der Hemmwirkung, welche o-Tr auf die Aktivität der ChE ausübt, wäre angesichts der muskulären Ausfallerscheinungen, die im Gefolge der o-Tr-Vergiftung auftreten, ein Zusammenhang zwischen der Fermenthemmung und der übrigen pharmakologischen Wirksamkeit der Substanz verständlicher. Zwar traten beim Kaninchen unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nur in den seltensten Fällen Lähmungen auf, die denen der menschlichen Erkrankung einigermaßen vergleichbar wären<sup>1)</sup>, und doch ist beim Kaninchen die Fermentblockierung ein konstantes, charakteristisches Symptom der Vergiftung, welches schon in den leichtesten Fällen ohne alle klinischen Erscheinungen zu sehen ist und das die übrigen Krankheitssymptome zuweilen lange überdauert.

Solche Bedenken und Einwände liessen sich auch gegen unsere eingangs erwähnte Vermutung, dass die Hemmung der ChE-Aktivität für den Wirkungsmechanismus des o-Tr mitverantwortlich sei, anführen. Immerhin vereinigt hier diese Annahme eine grössere Wahrscheinlichkeit auf sich, da sie sich mit dem klinischen Krankheitsbild zwanglos in Einklang bringen lässt. Wir konnten in früheren Versuchen nachweisen, dass bei fortgeschrittenen Stadien der E-Avitaminose das Serum und verschiedene Organe bei Ratten einen verminderten Gehalt an ChE aufweisen<sup>2)</sup>. Auch dort gehen, wenn auch auf Grund einer ganz andern Genese, muskuläre Ausfallerscheinungen mit einer ChE-Verminderung einher. Auf Grund jener Befunde und der Versuchsergebnisse, über die wir hier berichten, erscheint es möglich, dass gewisse funktionelle Muskelstörungen auf einer Störung im Fermentstoffwechsel der ChE beruhen, oder mit einer solchen Störung zum mindesten parallel gehen. Es wird sich deshalb lohnen, auch bei andern Muskeldystrophien dem Verhalten der ChE vermehrte Aufmerksamkeit zu schenken, woraus sich vielleicht auch Hinweise auf die Therapie solcher Krankheitszustände ergeben könnten.

#### Zusammenfassung.

1. In Fortsetzung früherer Untersuchungen wird gezeigt, dass Tri-o-kresyl-phosphat (o-Tr) in vitro die Cholin-esterase (ChE) aus Serum, Gehirn und Leber des Menschen sowie des Kaninchens zu hemmen vermag.
2. Das Hemmungsvermögen von o-Tr ist verschieden stark, je nach der Provenienz des Ferments.
3. Beim Kaninchen, welchem o-Tr in subletalen Dosen verfüttert wurde, ist unmittelbar nach der Vergiftung weder im Serum noch in Gehirn und Leber mehr ChE nachweisbar. Die Aktivität des Ferments kehrt erst im Verlauf von Tagen wieder zur Norm zurück.

<sup>1)</sup> R. Staehelin, Schweiz. Med. Wschr. 1941, 1.

<sup>2)</sup> H. Bloch, Helv. 25, 793 (1942).

4. Von einer grösseren Reihe untersuchter Fermente lassen sich nur noch die Lipasen (Esterasen) aus Serum, Gehirn und Leber, sowie die Frauenmilch-lipase durch o-Tr hemmen. Auch hier ist die Hemmung verschieden stark, je nach der Herkunft des Ferments. Pankreas-lipase wird durch o-Tr nicht beeinflusst.
5. Beim o-Tr-vergifteten Kaninchen sind Serum-lipase und Serum-ChE gleichermassen blockiert. Dieser Verlust der Fermentaktivität geht mit den übrigen Vergiftungssymptomen parallel.

Basel, Laboratorium des Kinderspitals und Hygienisches  
Institut der Universität.

## 19. Apparat zur Bestimmung der Oberflächenspannung

von H. Mohler und J. Hartnagel.

(19. XII. 42.)

Im Zusammenhang mit der Bestimmung des Parachors wurde auf einen Apparat zur Messung der Oberflächenspannung hingewiesen<sup>1)</sup>, der in seinem mechanischen Teil inzwischen eine Verbesserung erfahren hat. Da die seinerzeit mitgeteilte Photographie zudem Einzelheiten nicht deutlich erkennen liess, geben wir hier eine Zeichnung wieder, aus der alles Wünschbare zu ersehen ist (Fig. 1).

Wie schon in der ersten Mitteilung ausgeführt wurde, beruht die Methode auf der Messung der Steighöhe in Kapillaren. Die Oberflächenspannung  $\gamma$  ist für eine gegebene Kapillare

$$\gamma = \text{const. } h \, s \, \text{dyn cm}^{-1}$$

Der Apparat besteht im wesentlichen aus Messgefäss<sup>2)</sup> und Anordnung zur Herstellung eines konstanten Überdruckes. Der Vorteil des Apparates beruht darauf, dass die Messung der absoluten Steighöhe, die bekanntlich Schwierigkeiten bereitet, nicht nötig ist. In das Messgefäss G wird immer genau 0,50 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit eingefüllt, womit der untere Meniskus als konstant betrachtet werden darf und mit in die Apparaturkonstante eingeht. Der Apparat wird empirisch mit Flüssigkeiten von bekannter Oberflächenspannung geeicht, indem das Produkt aus Höhe des obern Meniskus und spezifischem Gewicht gegen die entsprechenden Werte für die Oberflächenspannung in einem Koordinatensystem aufgetragen wird. Die Schnittpunkte ergeben eine Gerade, die umgekehrt gestattet, aus einem experimentell bestimmbar Produkt aus Höhe des obern Meniskus und spezifischem Gewicht eine unbekannte Oberflächenspannung abzulesen.

Damit der Meniskus in allen Fällen höher liegt als die Stelle, an der die Kapillare eingeschmolzen ist, wird mit Überdruck gemessen,

<sup>1)</sup> H. Mohler und J. Sorge, *Helv.* **23**, 119 (1940).

<sup>2)</sup> Ein ähnliches Messgefäss findet sich in *Ostwald-Luther*, Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung physiko-chemischer Messungen, Leipzig (1931).