Bestimmung der Beeinflussung der Viscositätsherabsetzung des Systems Testikel- bzw. *Clostridium perfringens*- Hyaluronidase und Hyaluronsäure durch Pharmaka

E. LIENERT und W. THORSELL

*Pharmakologisches Institut der Tierärztlichen Hochschule in Wien; Chem. Abt. der
Königlichen Tierärztlichen Hochschule, Experimentalfältet, Schweden*

In Orientierungsversuchen wurde viscosimetrisch geprüft, ob die contractive Wirkung von Phenylmercuriazetat, Chinosol und Chininsulfat (Baker ¹) mit einer Hemmung des Testikelhyaluronidasystems und ob die antiseptische Wirkung von Phenylmercuriazetat, Mercurochrom, Eosin, Chinosol, Chininsulfat mit einer Hemmung des *Clostridium*-Hyaluronidase-Systems einhergeht.

Die genannten Substanzen, sowie Cocain und die Antimonpräparate Kalium-Antimonyltartrat und Antimosan wurden zwecks Ermittlung einer Hemmwirkung auf beide bzw. einer eventuellen spezifischen Hemmwirkung auf eines der beiden Enzymsysteme bei deren pH-Optima (pH $\approx$ 7 bzw. $\approx$ 6,0; McClean ²) geprüft.

Redoxmessungen wurden durchgeführt, um eventuelle Zusammenhänge zwischen rH und Hyaluronidasewirkung bzw. Hemmung festzustellen.

MATERIAL UND METHODIK

Für die Viscositätsbestimmungen wurden Ostwald-Viscosimeter mit Auslaufzeiten für Aqua dest. (20° C) von 20, 40, 60 und 80 Sec. verwendet. Für jede Versuchsreihe wurden die gleichen Viscosimeter benützt.

Als Puffer wurden folgende Lösungen benützt:

a) 0,1 M Azetat, pH = 6,2,	b) 0,1 M Phosphat, pH = 6,9,
0,15 M NaCl, rH $\approx$ 28 (20° C)	0,15 M NaCl, rH $\approx$ 29 (20° C)

Die Hyaluronsäure* war ein reines und relativ niedermoleculares Produkt. Sie wurde mit Puffer als Lösungsmittel als 0,3 %ige Lösung verwendet.

Folgende Enzymsysteme fanden Verwendung:

* Wir danken Herrn Prof. G. Blix, Vorstand des Institutes für Medizinische Chemie der Universität Uppsala, für deren Überlassung.

Abb. 1.

0, 1, 2, 3, 4 = Viscositätsmass (rel.)
 a, b, c, d = Lösungen
 H = Hyaluronsäure
 P = Puffer.

a) Das Stierhodenhyaluronidasepräparat »Hyalas« (AB Leo, Schweden) mit 1 mg Methylgelatine als Stabilisator pro 2,5 VRE. Die Versuchslösung enthielt 50 VRE/100 ml Puffer.

b) Autolysat von *Clostridium perfringens*, zell- und sporenfrei, pH korrigiert auf 6,2 bzw. 6,9.

Folgende Substanzen wurden mit Ausnahme von Antimosan, das in 6,3 %iger Lösung Verwendung fand, in 4 %iger oder gesättigter pH-kontrollierter Lösung geprüft: Phenylmercuriazetat (technisch), Chinosol (Chinosolfabriken A.G., Hamburg), Chininsulfat (Pharmakopoeware), Mercurochrom (technisch), Eosin gelblich (Bayer), Cocainchlorid (Pharmakopoeware), Kaliumantimonyltartrat (Pharmakopoeware), Antimosan (Behring).

Die Viscosimeterversuche wurden im Thermostaten bei $37,0 \pm 0,1$ °C ausgeführt. Es wurden 3 ml einer 0,3 %igen Hyaluronsäurelösung eingebracht und 2 ml von einer der Lösungen a, b, c, und d (s. u.) mit gleichzeitigem mässigen Durchblasen von Luft zugesetzt. Die Auslaufzeiten wurden nach 2, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 und 360 Minuten bestimmt. Lösung a bestand aus 1 ml Enzymlösung und 2 ml Puffer, Lösung b aus 1 ml einer Lösung mit der zu prüfenden Substanz und 2 ml Puffer, Lösung c aus 1 ml Enzymlösung, 1 ml einer Lösung der zu prüfenden Substanz und 1 ml Puffer. Lösung d war Pufferlösung. Als Kontrolle wurden die Auslaufzeiten einer Mischung aus 3 ml Puffer und 2 ml der a-, b-, c- und d-Lösung verwendet. Sämtliche Lösungen waren vorgewärmt, der pH-Wert wurde bei 20° C elektrometrisch kontrolliert.

Die Redoxmessungen wurden mit den gleichen Lösungen, mit denen die Viscositätsbestimmungen vorgenommen wurden, ausgeführt. Die Lösungen wurden mit Paraffinum liquidum überschichtet, die EMK wurde bei 20° C mit einem Radiometerapparat, Typ PHM 3 [System: (–) gesättigte Kalomelektrode / gesättigte KCl-Lösung / (1/4 %iger Agar-Agar mit 16 %iger NH_4NO_3 -Brücke) Probelösung / blanke Platin-Elektrode (+)] ermittelt.

Die Platinelektroden verblieben während der Versuchszeit in der Versuchslösung. Sie waren durch eine 0,1 M FeCl_3 -Lösung kontrolliert. Die Messungen wurden nach

1, 2, 3, 4, 6 und 24 Stunden oder bis zur EMK-Änderung von ca. 6 mV/Stunde durchgeführt.

Die Werte der Redoxmessung wurden in E_H -Werte umgerechnet. Die rH-Werte wurden mittels Jörgensens Nomogramm ermittelt (Jörgensen ³).

ERGEBNISSE

Zur qualitativen Beurteilung der Viscosimeterversuche wurden die Ergebnisse in Diagrammform aufgezeichnet (s. Abb. 1 als Beispiel für eine Auslaufzeit für Aqua dest. (20° C) von 60 Sec.) und dann in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1.

	pH 6,2						pH 6,9					
	Hyaluronsäure											
	ohne Enzym		Clostr. enzym		Testik. Hyaluro- nidase		ohne Enzym		Clostr. enzym		Testik. Hyaluro- nidase	
	Visc.	rH	Visc.	rH	Visc.	rH	Visc.	rH	Visc.	rH	Visc.	rH
ohne Pharmaka	4	28	0	32	1	31	4	34	1	31	0	29
Phenylmer- curiazetat	4	28	3	27	1	30	4	32	1? 2	26	0	31
Chinosol	4	30	0	30	2	33	4	31	1	31	2	30
Chininsulfat	4	31	0	29	1? 2	30	4	31	1	—	1? 0	31
Mercurochrom	4	26	4	29	4	26	4	30	4	30	4	27
Eosin	4	30	4	32	4	31	4	35	4	31	4	31
Cocainchlorid	4	31	0	—	1	29	4	30	1	31	0	35
Kaliumantimo- nyltartrat	4	27	0	—	1	29	4	28	1	—	0	29
Antimosan	4	28	0	28	1? 2	27	4	28	1 ?	30	0? 1	31

Die Untersuchungen liessen erkennen, dass nur Mercurochrom und Eosin beide Enzymsysteme sowohl bei pH 6,2 als auch bei 6,9 hemmen. Ein mehr differenzierter Effekt wurde mit Phenylmercuriazetat erhalten. Diese Substanz hemmte nur das Clostridiumenzymssystem bei pH 6,2 deutlich, eine weniger deutliche Hemmwirkung übte sie bei pH 6,9 aus. Chinosol hemmte nur das Testikelenzymssystem und zwar ausgeprägter bei pH 6,9 als bei pH 6,2. Die Wirkungen der übrigen Substanzen waren schwierig zu beurteilen. Es scheint aber so, dass Antimosan und Chininsulfat das Testikelenzymssystem hemmen.

Cocain und Kaliumantimoniytartrat hemmten die Viskositätsherabsetzung nicht.

Die rH-Werte schwankten in sämtlichen Systemen zwischen 26 und 35.

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die contraceptive Wirkung von nitrierter und azetylierter Hyaluronsäure ging nach Pincus⁴ mit einer Hemmung von Testikelhyaluronidase einher. In Übereinstimmung mit Mc Cullagh u. Mitarbeitern⁵ ging jedoch die contraceptive Wirkung der geprüften Phenylmercuriverbindung nicht mit einer Hemmung der Testikelhyaluronidase einher; es scheint deshalb die genannte Wirkung auf andere Weise als durch einen Antihyaluronidaseeffekt zustandezukommen. Mit der antiseptischen Wirkung von Phenylmercuriazetat scheint eine Hemmung des Clostridiumenzymsystems besonders bei pH 6,2 einherzugehen. Die unterschiedliche Beeinflussbarkeit der beiden Enzyme differenter Genese beleuchtet deren Verschiedenheit.

Da Chinisol und ev. Chininsulfat, wenn auch nur schwach das Testikelhyaluronidasesystem und nur dieses hemmten, kann diese Wirkung zu deren nicht sehr ausgeprägten contraceptiven Wirkung möglicherweise beitragen. Die antiseptische Wirkung der beiden Substanzen geht nicht mit einer Hemmung des Clostridiumenzymsystems einher.

Die antiseptisch wirkenden Substanzen Mercurochrom und Eosin zeigten keine spezifische Hemmwirkung. Beide Enzymssysteme wurden bei pH 6,2—6,9 gehemmt. Die antiseptische Wirkung von Mercurochrom steht möglicherweise im Zusammenhang mit dieser Hemmung.

Cocainchlorid und Kaliumantimonyltartrat waren bei pH 6,2 und 6,9 ohne spezifische Wirkung, da die Systeme unbeeinflusst blieben. Dagegen zeigte Antimosan eine schwache spezifische Hemmwirkung auf das Testikelhyaluronidasesystem bei pH 6,2 und 6,9, nicht aber auf das Clostridiumenzymssystem.

Die Redoxmessungen zeigten, dass Testikel- und Clostridiumhyaluronidase bei rH 29—32 (pH 6,2—6,9; 20° C) wirkten. Die rH-Werte liegen höher als die, die man bei der Spermieneindringung ins Ei (rH 2—14, pH 7, 37° C; Moricard⁶) und beim Wachstum und bei der Vermehrung von *Clostridium perfringens* findet (rH 6—9, pH 6,5—7,6, 37° C; Reed u. Mitarbeiter⁷). Mit Rücksicht auf die Schwierigkeiten der rH-Bestimmungen, die rH-Werte von 26—35 (pH 6,2—6,9; 20° C) ergaben, kann man keinen bindenden Zusammenhang zwischen Hemmung und rH erkennen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Contraceptiva und Antiseptica Phenylmercuriazetat, Chinisol, Chinin und die Antiseptica Mercurochrom und Eosin sowie Cocain, Kaliumantimonyltartrat und Antimosan wurden viscosimetrisch auf Testikel- und Clostridium perfringens-Hyaluronidasesystemwirksamkeit bei pH 6,2 bis 6,9 geprüft. Auch Redoxmessungen wurden vorgenommen.

Das Testikelhyaluronidasesystem wurde nur durch Chinisol, Chinin, Mercurochrom, Eosin und ev. Antimosan gehemmt. Das Clostridiumhyaluronidasesystem wurde nur von Phenylmercuriazetat, Mercurochrom und Eosin gehemmt.

Die rH-Werte (26—35) liessen keine Beziehung zur Hemmung erkennen.

Wir danken Herrn Prof. K. Sjöberg und Herrn Prof. H. Hedström für ihr Interesse und Entgegenkommen.

SCHRIFTTUM

1. Baker, J. R. *Lancet* **235** (1938) 882.
2. Mc Clean, M. *Biochem. J. (London)* **37** (1943) 169.
3. Jørgensen, H. *Redox-maalinger*, København (1945).
4. Pincus, G. *Arch. Biochem.* **19** (1948) 388.
5. Mc Cullagh, D. R., Cassidy, J. W., Valentine, F. und Tolksdorf, S. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **71** (1949) 295.
6. Moricard, R. *Bull. Soc. Gynecol., Paris* **1** (1949) 484.
7. Reed, G. B. und Orr, J. H. *J. Bact.* **45** (1943) 309.

Eingegangen am 13. Januar 1954.