

même dose chez le discoglosse et $\frac{1}{2}$ h après l'injection de 10 mg/kg de réserpine chez le même crapaud.

SUZANNE LIÉBECQ-HUTTER et Z. M. BACQ

Institut d'Histologie et Laboratoire de Pathologie et Thérapeutique Générales, Université de Liège (Belgique), le 19 décembre 1957.

Summary

30 min after an intraperitoneal injection of reserpine (5 or 10 mg/kg) in the frog (*Rana temporaria*) and in the toad (*Discoglossus pictus*), a substance which has the properties of 5-hydroxytryptamine (argentaaffine reaction, azoreaction, indoreaction and fluorescence in U.V. after formaldehyde) disappears from the skin glands; the histochemical reactions are more positive again $1\frac{1}{2}$ to 2 h after the injection of reserpine.

Beeinflussung der Gerinnungswirkung von Heparin durch Serotonin und Tryptamin¹

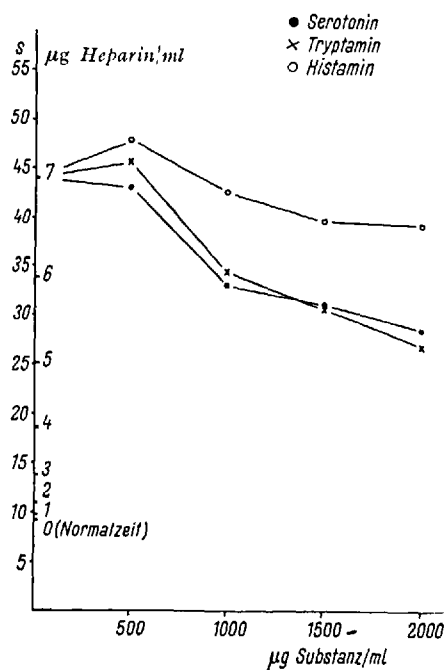
Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Heparin die Wirkung von Serotonin an isolierten Organen² und *in vivo*³ abschwächt bzw. aufhebt. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Wirkung von Serotonin und anderen Stoffen auf die durch Heparin verlängerte Gerinnungszeit im Cofaktor-Fibrinogen-System.

Methodik. Für die Untersuchungen verwendeten wir die folgenden Substanzen⁴: Fibrinogen, Heparin-Cofaktor II (Cohn-Fraktion IV/4), Heparin (108 IE/mg), Thrombin (40–60 NIH-Einheiten/mg; Biochemicum Roche), Serotonin (5-Hydroxytryptamincreatininsulfat; Biochemicum Roche), Tryptamin (Hydrochlorid; Biochemicum Roche), Tyramin (Hydrochlorid; Biochemicum Roche), Isoamylamin (Hydrochlorid; Biochemicum Roche), Histamin (Dihydrochlorid). Sämtliche Substanzen wurden in $\frac{1}{15}$ molar m Phosphatpuffer nach SÖRENSEN von pH 7,24 bis 7,26 gelöst.

100 mg Fibrinogen und 400 mg Heparin-Cofaktor wurden unter Zugabe von 1 Tropfen Octylalkohol in 20 ml Puffer gelöst und die Lösung filtriert. Thrombin verdünnten wir, ebenfalls unter Zugabe von Octylalkohol mit Puffer, so dass sich in der unten beschriebenen Versuchsanordnung mit einer 7 μ g/ml enthaltenden Heparinlösung eine Gerinnungszeit zwischen 40 und 60 s ergab. Die Cofaktor-Fibrinogen- und die Thrombinlösungen wurden während der ganzen Versuchsdauer eisgekühlt in silikonierten Gefässen aufbewahrt.

Es wurden jeweils 0,2 ml des Cofaktor-Fibrinogen-Gemisches und 0,2 ml einer 1, 2, 3, 4, 5, 6 oder 7 μ g/ml Heparin enthaltenden Lösung in ein Glasröhrchen von 10 mm Innendurchmesser gegeben, geschüttelt, das Röhrchen während 30 s im Wasserbad bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 0,2 ml Thrombinlösung die Zeit bis zum Auftreten des Koagulums ermittelt. Durch Bestimmung der mit den erwähnten verschiedenen Heparin-

konzentrationen zustande kommenden Verlängerungen der Gerinnungszeit (Antithrombinzeit) erhielten wir eine Eichkurve für Heparin. Zur Prüfung des Einflusses der verschiedenen Stoffe auf die durch Heparin verlängerte Antithrombinzeit stellten wir Lösungen her, die ausser einer konstanten Menge Heparin 500, 1000, 1500 bzw. 2000 μ g/ml der einzelnen Substanzen enthielten. Zur Erfassung eventueller, durch die zugegebenen Substanzen bedingter pH-Verschiebungen wurde das pH der Lösungen mit einer kombinierten Glaselektrode (Titriskop Metrohm AG, Herisau) gemessen.



Ergebnisse. Die Resultate der Gerinnungsversuche mit Serotonin, Tryptamin und Histamin sind in der Abbildung graphisch dargestellt. Auf der Ordinate sind die Gerinnungszeit in Sekunden, auf der Abszisse sind die getesteten Lösungen (μ g Substanz mit je 7 μ g Heparin) aufgetragen; zudem sind die für die verschiedenen Heparinkonzentrationen ermittelten Antithrombinzeiten (Heparineichkurve) beigelegt. Aus dieser Abbildung geht hervor, dass Serotonin und Tryptamin in Mengen von 1000, 1500 und 2000 μ g/ml die Antithrombinzeit eindeutig verkürzen; 1000 μ g/ml Substanz bewirken eine Verkürzung der Antithrombinzeit, die der Neutralisation von etwa 1 μ g/ml Heparin entspricht; diese heparinneutralisierende Wirkung von Serotonin und Tryptamin ist unabhängig vom Intervall, das zwischen dem Herstellen der Lösungen und ihrer Zugabe zum Cofaktor-Fibrinogen-Gemisch liegt. Die beiden Stoffe verändern andererseits die Normalgerinnungszeit (ohne Heparin) nicht. Zugabe entsprechender Mengen Histamin bewirkt im Gegensatz dazu keine wesentliche Veränderung der durch Heparin verlängerten Antithrombinzeit. Auch Isoamylamin und Tyramin verursachen, in den gleichen Mengen zugegeben wie Serotonin und Tryptamin, keine Veränderung der Antithrombinzeit.

Wie ergänzende Untersuchungen ergaben, wird das pH der Pufferlösungen durch Serotonin und Tryptamin in den verwendeten Konzentrationen nicht verändert (Abweichung < 0,1). Dagegen bewirken 1000 bis 2000 μ g/ml Histamin in den Pufferlösungen einen pH-Abfall von 0,4 bis 1,5. Kontrollversuche mit sauren Pufferlösungen von

¹ Für wertvolle Ratschläge im Verlaufe der Untersuchungen sind wir den Herren Dr. R. MARBET, Dr. ANDRÉ STUDER und PD Dr. A. WINTERSTEIN, Wissenschaftliche Laboratorien der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG. in Basel zu Dank verpflichtet.

² R. KELLER, *Exper.* 13, 112 (1957). – G. SMITH und A. N. SMITH, *Surg. Gynec. Obstet.* 101, 691 (1955).

³ G. SMITH und A. N. SMITH, *Surg. Gynec. Obstet.* 101, 691 (1955).

⁴ Der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG. in Basel danken wir für die grosszügige Überlassung der notwendigen Versuchsmengen.

verschiedenem pH allein zeigten, dass schon eine Verminderung des Ausgangs-pH von 7,25 um mehr als 0,25 zu einer deutlichen Verkürzung der Gerinnungszeit führen. Die bei grösseren Histaminmengen beobachtete Verkürzung ist ausschliesslich durch die pH-Verschiebung bedingt.

Diskussion. Die vorliegenden, mit dem Standardtest der Heparin-Antithrombinwirkung durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass Serotonin und Tryptamin in hohen Dosen eine heparinneutralisierende Wirkung ausüben, währenddem Histamin, Tyramin und Isoamylamin keinen Effekt haben. Die heparinneutralisierende Wirkung von Serotonin im System Cofaktor-Fibrinogen + Heparin + Thrombin ist, wenn auch bedeutend schwächer, analog derjenigen von Protamin (vgl.⁵). Die Untersuchungen geben damit neben den erwähnten, an isolierten Organen und *in vivo* erhobenen Befunden neue Anhaltspunkte für die Annahme, dass zwischen Serotonin und Heparin eine beide Stoffe neutralisierende Bindung zustande kommen kann. Die Frage, ob den vorliegenden Ergebnissen für den Ablauf der Gerinnung *in vivo* Bedeutung zukommt, bleibt offen.

R. KELLER

Institut für Hygiene und Arbeitsphysiologie der ETH, Zürich, 14. Februar 1958.

Summary

Investigations in the cofactor-fibrinogen system have shown that serotonin and tryptamine, although only in relatively high doses, reduce the antithrombin time prolonged by the action of heparin. Histamine has no such effect on the action of heparin, nor have tyramine and isoamylamine.

⁵ R. MARBET, A. STUDER und A. WINTERSTEIN, *Thrombose und Embolie* (Benno Schwabe, Basel 1955), p. 362.

On the Nature of Some Fluorescent Substances of Pterin Type in the Adult Skin of Toad, *Bufo vulgaris formosus*

In 1952, one of us¹ proposed the name Rana-chrome 1, 3, 4 and 5 for the fluorescent substances isolated from the skin of *Rana nigromaculata*. The aqueous solution of Rana-chrome 1, 3 or 5 shows a blue fluorescence, and the first two are transformed by irradiation or oxidation into Rana-chrome 5, 2-amino-4-hydroxypteridine-6-carboxylic acid. Rana-chrome 1 is found in most of the amphibians so far examined, and also in certain insects (e.g. *Drosophila*, *Bombyx*). This substance seems to be very likely the same as biopterin². Rana-chrome 4 is identical with isoxanthopterin³. On the other hand, we⁴ reported the presence of fluorescent substances of pterin type in the

skin of toad: namely, small amounts of Rana-chrome 1, the complete absence of Rana-chrome 3, considerable amounts of Rana-chrome 5 and Bufo-chrome (= Bufo-chrome 1) presumably characteristic of *Bufo* species. These substances and riboflavin were found in considerable amounts in the colored part of the dorsal skin, while in the black spot of the ventral skin riboflavin alone was found. In the white or yellow part, very little of such substances occurred. The recent investigation revealed that the substance reported as Rana-chrome 1 in the previous paper was a mixture of two different components, the greater part of which differs from Rana-chrome 1 and belongs to the substance which we name 'Bufo-chrome 2'. The other component, Rana-chrome 1, exists only in traces and is rather difficult to recognize.

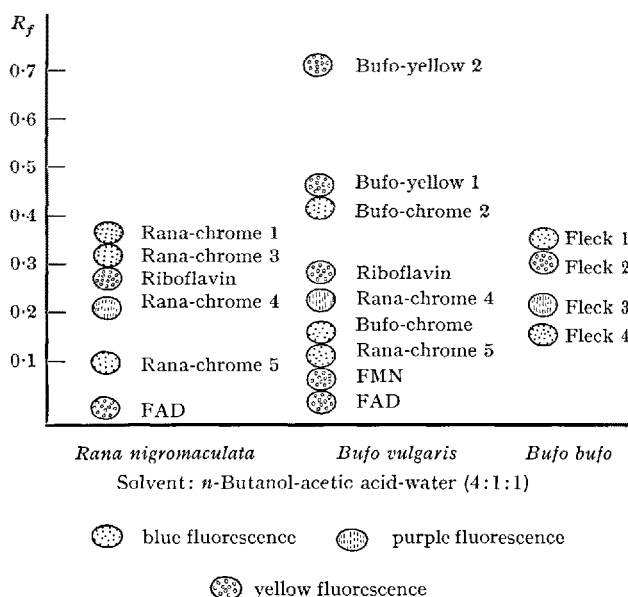


Fig. 1.—Chromatogram of fluorescent substances isolated from the dorsal skin of *Bufo vulgaris* and *Rana nigromaculata*, and that of *Bufo bufo* reported by ZIEGLER-GÜNDER⁵.

The present paper deals with the nature of these two Bufo-chromes, together with two yellow substances isolated from the same material by the method of paper chromatography. Extraction was carried out by the slight modification of AWAPARA's method⁶ or with 10% trichloroacetic acid. The chromatogram is shown in Figure 1.

I. Bufo-chrome

(a) Results on paper chromatography: The R_f values of Bufo-chrome in various solvents differ from those of Rana-chrome 1 (Table I), although both behave chemically in a similar way (see below). (b) Effect of light: Photolysis of Bufo-chrome occurred fairly rapidly in the alkaline solution (pH 9.1) and rather slowly in the acidified medium (pH 2.5). The photolyzed product was determined as Rana-chrome 5 in respective cases. (c) Oxidation with MnO_2 : The material treated was almost perfectly oxidized to Rana-chrome 5. (d) Ultra-violet absorption spectrum: Figure 2 shows the absorption spectra of Bufo-chrome in acid and alkaline solutions.

⁵ I. ZIEGLER-GÜNDER, *Z. Naturf.* 11b, 494 (1956); *Biol. Rev.* 31, 313 (1956).

⁶ J. AWAPARA, *Arch. Biochem.* 19, 172 (1948).

¹ T. HAMA, *Zool. Mag.* 61, 89 (1952); *Exper.* 9, 229 (1953). — T. HAMA and T. GOTO, *C. R. Soc. Biol.* 148, 754 (1954). — T. HAMA, T. GOTO and K. KUSHIBIKI, *C. R. Soc. Biol.* 148, 1313 (1954).

² E. L. PATTERSON *et al.*, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 3167 (1955); 78, 5781, 5868, 5871 (1956). — H. S. FORREST and H. K. MITCHELL, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 4865 (1955). — M. VISCONTINI *et al.*, *Helv. chim. Acta* 38, 397, 1222, 2034 (1955).

³ S. NAWA *et al.*, *J. Biochem.* 41, 657 (1954).

⁴ T. HAMA *et al.* *Science (Japan)* 22, 542 (1952). — T. HAMA and M. OBIKA, *Zool. Mag.* 66, 92 (1957).