

Mitoses were found rather rarely both in transplanted eggs and in controls, so that no conclusions may be drawn.

Pycnotic cells were observed only in irradiated blastocysts. All pycnotic cells were stained deeply green after Unna-Brachet, and were Feulgen positive. ERRERA<sup>7</sup>, using stronger doses than we did, has found that the affinity of the nuclei for methyl-green is weak after UV irradiation, but BODENSTEIN's<sup>9</sup> observations following treatment with mustard gas were the same as ours.

Out of 8 blastocysts 6 had 34 pycnotic cells of a total number of 208 cells, i. e. 16.35%.

As regards their position, in the majority of blastocysts the pycnotic cells were observed between the cells of inner cell mass and relatively rarely in the trophoblast. The difference is significant ( $X^2 = 4.825$ ,  $P < 0.05$ ).

The cytoplasm was normally stained with pyronine.

It can be concluded that the effect of UV irradiation (1500 ergs/mm<sup>2</sup>) may be observed about 17 h after irradiation: (1) the average number of the cells of a blastocyst is smaller than in controls, which may be explained by an inhibition of the mitotic process in the interphase of all cells,

(2) the pycnotic cells are readily visible and stain with methyl-green, especially between the cells of the inner cell mass.

N. ŠKREB and M. MÜLLER

Department of Biology, Faculty of Medicine, Zagreb (Yugoslavia), November 6, 1959.

### Résumé

Sur le blastocyste du rat, irradié au cours de la transplantation par les rayons U. V. à la dose de 1500 ergs/mm<sup>2</sup>, on a pu observer précédemment que le développement du bouton embryonnaire est bloqué, tandis que le trophoblaste continue à se développer.

Dans cette note, nous avons voulu mettre en évidence les effets immédiats de cette irradiation:

Bien que les affinités du cytoplasme et du noyau pour le mélange vert de méthyle-pyronine restent inchangées, les cellules ne continuent pas à se diviser. Les noyaux pycnotiques sont relativement plus fréquents dans le bouton embryonnaire que dans le trophoblaste.

### «Bindung» eines synthetischen Polypeptides (Hypertensin) an Heparin und Freisetzung des Peptides durch Compound 48/80 *in vitro*

Der in den Mastzellen angereicherte Polysaccharid-schwefelsäureester Heparin liegt in diesen wohl vornehmlich als Histamin-heparinat vor<sup>1,2</sup>. Derart gebundenes Histamin kann sowohl *in vitro* wie *in vivo* durch verschiedene sogenannte Histamin-Liberatoren wie Compound 48/80<sup>3,4</sup> freigesetzt werden. WERLE und AMANN<sup>1</sup> konnten anhand von Dialyseversuchen zeigen, dass in Gemischen von Histamindihydrochlorid und Heparin (in Form des Na-Salzes) eine Bindung stattfindet mit Optimum im sauren Milieu (1%ige Essigsäure). Histamin lässt sich aus dieser Bindung durch Di- und Polyamine verdrängen. Da höhere Amine zu den wirksamsten Histamin-Liberatoren gehören<sup>1,5</sup>, lag es nahe zu untersuchen, ob Heparin auch Peptide zu binden vermag, und ob solche «gebundene» Peptide durch einen Histamin-Liberator wie Compound 48/80 freigesetzt werden können. Unsere Versuche befassten sich zur Hauptsache mit einem synthetischen Oktapeptid, Hypertensin, dessen Synthese und Pharmakologie von SCHWYZER *et al.*<sup>6</sup> sowie MEIER *et al.*<sup>7</sup>

beschrieben wurden. Im Gegensatz zu der Versuchsanordnung von WERLE und AMANN wurde nicht handelsübliches Heparin, sondern Heparinsäure verwendet, welche durch Behandlung von Handelsheparin (Hoffmann-La Roche) mit einem Ionenaustauscher (Amberlite J. R. 120 in der H<sup>+</sup>-Form) gewonnen wurde<sup>8</sup>. Auf diese Weise erhaltene Heparinsäure besaß die gleichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie sie von WILANDER für ein mittels Elektrodialyse gewonnenes Präparat beschrieben wurden<sup>9</sup>. Die Bindungsfähigkeit eines solchen Heparinsäurepräparates gegenüber Histamin verhielt sich im übrigen etwa wie diejenige von Na-Heparinat in essigsaurem Milieu; ebenso konnte Histamin durch Compound 48/80 aus dieser Bindung freigesetzt werden. Der Nachweis der aufgetretenen Bindung zwischen Heparinsäure und Hypertensin sowie der Freisetzung wurde wie folgt erbracht: 4 mg Hypertensin (als essigsaures Salz) wurden in 6 ml destilliertem Wasser gelöst und bei 20°C gegen 194 ml destilliertes Wasserdialysiert (Dialyse-Schüttelverfahren). Nach beendeter Dialyse wurde der Hypertensin-gehalt des Aussendialysats an drei verschiedenen Testobjekten (Blutdruck des Huhns, isolierter Rattenuterus und isoliertes Meerschweinchen-Ileum) ausgetestet. Es wurde zum Beispiel gefunden, dass nach 3 h im gesamten mindestens 0,5 mg Hypertensin ins Aussendialysat übergetreten waren. Hypertensin erwies sich demnach erwartungsgemäß als eine im Vergleich zu Histamin langsam dialysable Substanz. Aus einem Gemisch von 4 mg Hypertensin mit 7 mg Heparinsäure trat unter den gleichen Versuchsbedingungen weniger als 0,001 mg Hypertensin ins Aussendialysat über. Der Zusatz von 4 mg des Histamin-Liberators Compound 48/80 zu einem Gemisch von 4 mg Hypertensin und 7 mg Heparinsäure erhöhte den Durchtritt von Hypertensin deutlich (auf 0,24 mg in 3 h).

Obwohl unsere Befunde *in vitro* und ohne Berücksichtigung verschiedener physikalisch-chemischer Faktoren (pH, Diffusionsgeschwindigkeit, usw.) erhoben wurden, erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass «Bindungs»-Reaktionen von der Art der hier beschriebenen eine prinzipielle physiologische Bedeutung besitzen. Jedenfalls weisen sie auf Vorgänge hin, die im Zusammenhang mit der physiologischen und pathogenetischen Funktion von Peptiden sowie homöostatischen Regulationsprozessen unter Beteiligung saurer Polysaccharide eine Rolle spielen könnten.

R. JAKES, K. KÜTTNER,  
H. J. BEIN und R. MEIER

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, 11. Januar 1960.

### Summary

It is shown that a synthetic octapeptide, hypertensin, can be bound to heparin *in vitro* in a fashion similar to that of histamine. Hypertensin can be liberated from this 'complex' by Compound 48/80.

<sup>1</sup> E. WERLE und R. AMANN, *Naturwissenschaften* **42**, 583 (1955); *Klin. Wschr.* **34**, 624 (1956).

<sup>2</sup> Editorial: *Brit. med. J.* **2**, 219 (1956).

<sup>3</sup> Herrn Dr. A. C. WHITE, Wellcome Research Laboratories, Beckenham (England), danken wir auch an dieser Stelle für die Überlassung einer Versuchsmenge.

<sup>4</sup> W. FELDBERG und W. D. M. PATON, *J. Physiol.* **114**, 490 (1951).

<sup>5</sup> F. C. McINTOSH und W. D. M. PATON, *J. Physiol.* **109**, 190 (1949).

<sup>6</sup> W. RITTEL *et al.*, *Helv. chim. Acta* **40**, 614 (1957; *Angew. Chemie* **69**, 179 (1957)).

<sup>7</sup> R. MEIER *et al.*, *Exper.* **13**, 361 (1957).

<sup>8</sup> Herrn Dr. G. HUBER sind wir für die Herstellung von Heparinsäure zu Dank verpflichtet.

<sup>9</sup> O. WILANDER, *Skand. Arch. Physiol.* **81**, Suppl. 15 (1939).