

Fig. 1. Vervet 4.6 kg. 0.2 mg pilocarpine HCl in 0.01 ml placed on cornea of experimental eye at -60 min. The black bar indicates period of infusion of 5 μ l/min into both eyes simultaneously.

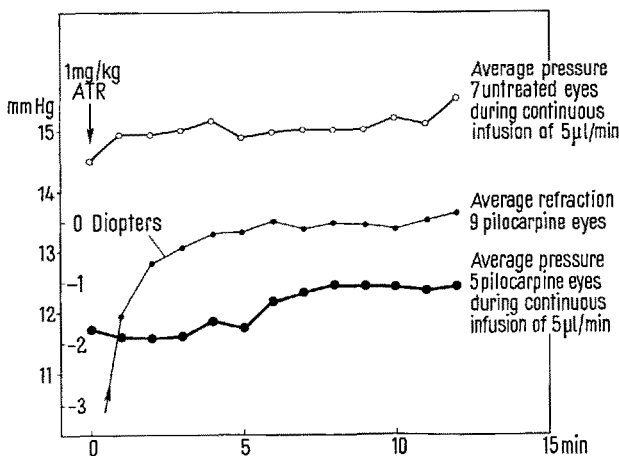


Fig. 2. Rapid disappearance of myopia but only small increase in resistance after 1 mg/kg atropine sulphate i.v. in vervet eyes treated with 0.2 mg/cornea of pilocarpine HCl.

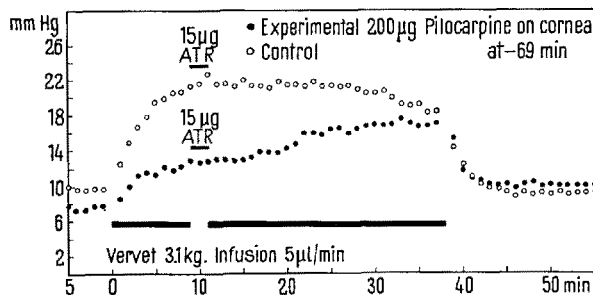


Fig. 3. Slow effect of 15 μ g atropine sulphate injected into the anterior chamber of both eyes on resistance of pilocarpine-treated eye.

The topmost curve of Figure 2 was obtained from 7 other monkeys. These eyes had not received any treatment except the topical lidocaine for cannulation. It is seen that the normal eye does not change its resistance noticeably despite the sudden cycloplegia.

The lowermost curve represents 5 eyes in 5 monkeys. Four of them had received 0.2 mg and one 0.3 mg pilocarpine HCl on the cornea 1 h before the experiment. In 4 of them retinoscopy was successful on the contralateral, non-cannulated eye during the pressure recording and these values are included in the average refraction curve. It is seen that there is only a small pressure rise as accommodation relaxes. The main part of the pressure difference between the two groups of eyes remains. If the pilocarpine effect had been due to ciliary muscle spasm, the pressure in the treated eyes would have started to rise towards the level of the control eyes as soon as the spasm was abolished.

Figure 3 shows that, even if a large dose of atropine is injected directly into the anterior chamber, the pilocarpine effect disappears only very slowly. This was so in 3 of 8 eyes while in 3 other eyes recovery was only moderately slow.

The main point of attack of pilocarpine in the normal primate eye thus cannot be the ciliary muscle, as far as the resistance-lowering effect is concerned. Probably the alkaloid acts directly or indirectly on the endothelial cells of the trabecular meshwork. Since the effect of pilocarpine is about the same (expressed in inverse resistance units) in normal eyes as in chronic simple glaucoma, it is probable that also the therapeutic effect in most cases is due to an action on the meshwork endothelium³.

Zusammenfassung. Mit Pilocarpin herabgesetzter Widerstand des Kammerwinkels des Meerkatzenauges wird durch Atropin viel langsamer aufgehoben als die entsprechend induzierte Ciliarmuskelkontraktion. Dieser Pilocarpineffekt dürfte daher auf einer direkten oder indirekten Beeinflussung des Endothels des Trabekelsystems beruhen.

E. BÁRÁNY

Pharmacological Institute, University of Uppsala (Sweden), April 19, 1962.

³ **Acknowledgments.** This work was done at the Department of Physiology of Makerere College School of Medicine, Kampala (Uganda). I want to thank Prof. C. P. LUCK for his kind hospitality and Miss I. DALHAGEN for her customary expert assistance.

Unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Angiotensinderivate gegen Abbau durch Plasma oder Nierenhomogenat

Das blutdrucksteigernde Oktapeptid Angiotensin mit der Struktur Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe wird *in vivo* durch verschiedene Peptidasen im Blut und Gewebe abgebaut¹⁻³. Die Angiotensin-abbauenden Fermente werden üblicherweise unter dem Sammelbegriff «Angiotensinase» zusammengefasst, ohne dass eine Substratspezifität nachgewiesen ist. Ebenso wenig ist bekannt, ob

Veränderungen des Angiotensinmoleküls die Empfindlichkeit gegenüber «Angiotensinase» verändern können. RINIKER und SCHWYZER⁴ haben neuerdings Angiotensine

¹ E. BRAUN-MENENDEZ, J. C. FASCIOLLO, L. F. LOLOIR, J. M. MUNOZ und A. C. TAQUINI, *Renal Hypertension* (CH. C. THOMAS, Springfield, Ill. 1946).

² I. H. PAGE und F. M. BUMPUS, *Physiol. Rev.* **41**, 331 (1961).

³ R. SCHWYZER und H. TURRIAN, *Vitamines and Hormones* **18**, 237 (1960).

⁴ B. RINIKER, H. BRUNNER und R. SCHWYZER, *Angew. Chemie* **74**, 469 (1962).

synthetisiert, deren Asparaginsäure statt in der natürlichen α -Stellung in β -Stellung im Molekül eingebaut ist. Wir untersuchten pressorische Wirkung und Resistenz gegen Abbau durch «Angiotensinase» folgender Verbindungen:

- α -L-Asp¹(NH₂)-Angiotensin II = H = Hypertensin «CIBA»
 α -L-Asp¹-Angiotensin II = A (80% L-, 20% D-Form)
 β -L-Asp¹-Angiotensin II = B (verunreinigt mit ungefähr 20% d. entsprechenden α -Verbindung)
 β -D,L-Asp¹-Angiotensin II = C (80% L-, 20% D-Form)
 α -L-Asp¹(NH₂)-Phe⁴-Angiotensin II = D

Stärke und Dauer der pressorischen Wirkung wurden am Blutdruck der 20 h vor Versuch nephrektomierten Ratte in Urethannarkose (1,4 g/kg s.c.) bestimmt.

Die Widerstandsfähigkeit der genannten Substanzen gegen Angiotensin-abbauende Fermente wurde in folgenden Systemen geprüft:

(a) Serum von Ratten, die 20 h vor Versuch nephrektomiert worden waren. (b) Rohextrakt aus Rattennieren. Dazu wurden 300 mg Frischgewebe mit 2 ml Tyrodelösung homogenisiert und das Homogenat 1:100 (v/v) mit Tyrodelösung verdünnt. (c) Human-Trockenplasma (Zentrallaboratorium des Schweizerischen Roten Kreuzes, Bern), das nach Vorschrift gelöst worden war. (d) Menschliches Frischplasma, das durch Heparinzusatz (50 E/ml Liquemin Roche) ungerinnbar gemacht worden war.

Serum, Homogenat oder Plasma wurden durch Zusatz von HCl oder NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Zum Ansatz wurde Soerensen-Phosphatpuffer von pH 7,4 in einer Menge von 1/10 des ursprünglichen Volumens zugefügt. Proben von 1,0 ml wurden im Wasserbad auf 37°C erwärmt

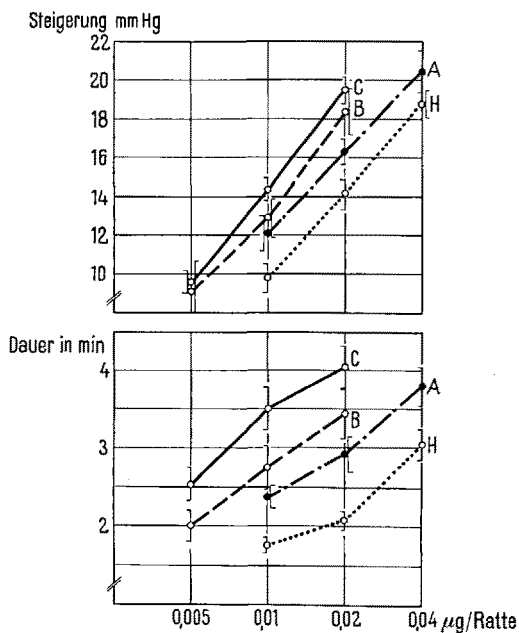


Fig. 1. Dosiswirkungskurven von Intensität (oben) und Dauer (unten) der pressorischen Wirkung von α -L-Asp¹(NH₂)-Angiotensin II = H = Hypertensin «CIBA»; α -L-Asp¹-Angiotensin II = A; β -L-Asp¹-Angiotensin II = B; β -D,L-Asp¹-Angiotensin II = C an Ratten in Urethannarkose. – Versuchszahl für: H: n = 30, A: n = 12, B: n = 10, C: n = 18. Angaben: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.

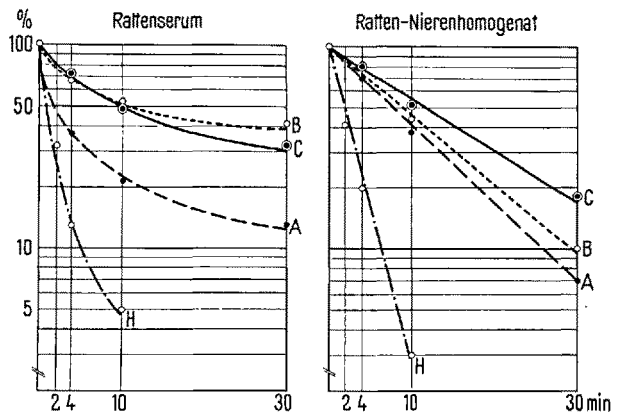


Fig. 2. «Angiotensinase»-Empfindlichkeit der in Figur 1 genannten Substanzen bei Inkubation in Rattenserum (oben) oder verdünntem Ratten-Nierenextrakt (unten) bei pH 7,4 und 37°C für verschiedene Zeiten. Die zu Beginn der Inkubation zugesetzte Menge von Angiotensin-II-Isomeren ist jeweils gleich 100% gesetzt; als Mass der Empfindlichkeit gegen abbauende Fermente wurde der nach Ende der Inkubation gefundene Prozentsatz an pressorischer Aktivität gewählt. Jeder Punkt ist ein Mittelwert aus 2–5 Bestimmungen. Die Differenzen zwischen einzelnen Versuchen zur «Angiotensinase»-Empfindlichkeit betrugen nie mehr als 15%, meist um 5–10%.

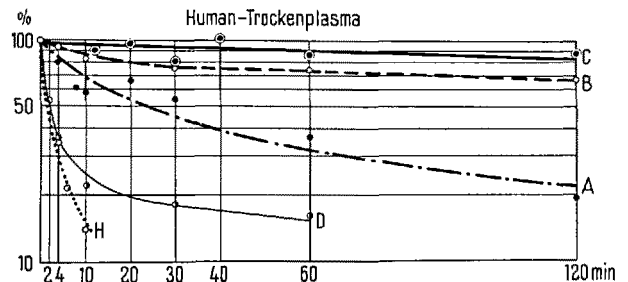


Fig. 3. «Angiotensinase»-Empfindlichkeit in Humantrockenplasma. Angaben wie in Figur 2.

und den Ansätzen H (Hypertensin) «CIBA» und A, die beide die gleiche pressorische Aktivität haben, in Mengen von 0,4, 0,2 und 0,1 µg/ml zugesetzt. Von Präparat B und C, die doppelt so wirksam wie die beiden erstgenannten Substanzen sind, wurden 0,2 und 0,1 µg/ml und von D, das nur 1/10 der Wirksamkeit von Hypertensin aufweist, 4,0 und 2,0 µg/ml zugefügt. Nach verschiedenen Zeiten wurde der bei 37° ablaufende Prozess durch Ansäuern auf pH 5,6 und 5 min Kochen im Wasserbad unterbrochen. Die Proben wurden anschliessend in Eiswasser abgekühlt, zentrifugiert und im Überstehenden die pressorische Aktivität am Blutdruck der nephrektomierten Ratte bestimmt. Als Vergleich dienten Standarddosen der jeweilig untersuchten Substanz, die in Tyrodelösung inkubiert und gekocht worden waren. Das Injektionsvolumen je Probe betrug 0,1 ml. Die Standarddosen von Hypertensin waren 0,01, 0,02 und 0,04 µg/Ratte, bei den anderen Präparaten je nach Wirksamkeit mehr oder weniger.

Das Amid Hypertensin (H) unterschied sich hinsichtlich Intensität der blutdrucksteigernden Wirkung von der entsprechenden freien Säure (A) nur wenig, wirkte jedoch kürzer. Die β -Verbindungen (B und C) zeigten untereinander kaum Differenzen. Vergleicht man jedoch die wirksamste der Verbindungen (C) mit Hypertensin (H), so ergibt sich eine doppelt so starke und mehrfach längere Wirkung von C (siehe Figur 1).

In allen Versuchen über Abbau der Angiotensine wurden die Amide (H und D) am raschesten inaktiviert. An zweiter Stelle bezüglich Empfindlichkeit gegen abbauende Fermente stand α -L-Asp¹-Angiotensin II (A). Von Rattenserum wurden die beiden Verbindungen B und C langsamer als die α -Verbindungen, untereinander jedoch mit ungefähr gleicher Geschwindigkeit zerstört. In Humanplasma fanden sich die gleichen Differenzen zwischen α - und β -Verbindungen. Im Rattennierenextrakt war ein deutlicher Unterschied hinsichtlich Inaktivierung nur zwischen Angiotensin-Amid (H) und den freien Säuren nachweisbar, nicht hingegen zwischen α - (A) und β -L-Asp¹-Angiotensin II (B) oder der entsprechenden D,L-Verbindung (C) (siehe Figur 2 und 3 sowie Tabelle).

Eine unterschiedliche Bindung an Eiweiss beim Koagulieren während des Kochens wurde ausgeschlossen. Unmittelbar vor Beendigung der Inkubation entnommene Proben wiesen die gleiche pressorische Aktivität auf wie das Überstehende nach der Ausfällung. Veränderungen der Inkubationstemperatur bei konstantem pH und konstanter Bebrütungszeit ergaben im Rattenserum die gleichen Unterschiede in der Abbaugeschwindigkeit zwischen den einzelnen Angiotensinen wie bei Variationen der Inkubationszeit. Bei Veränderungen des pH fand sich im Rattenserum der stärkste Abbau bei pH 7,4 mit einer grossen Differenz zwischen α - und β -Angiotensinen. Unter pH 5 verlief die Zerstörung viel langsamer und der Unter-

schied zwischen den Substanzen verschwand. Nachweis des Abbaus in Rattenserum mittels Chromatographie⁶ ergab für alle Angiotensine einen gemeinsamen Abbaupfad mit Freisetzung von Aminosäuren. Bei den beiden α -Angiotensinen (A und H) fand sich zusätzlich eine Zerstörung des Moleküls vom Aminoende her, die bei den β -Verbindungen (B und C) fehlte. Nähere Angaben hierzu bleiben einer ausführlichen Arbeit vorbehalten.

Zusammenfassend ergibt sich somit, dass zwischen Intensität und Dauer der pressorischen Wirkung einerseits und der Zerstörung der Angiotensine im Plasma andererseits ein deutlicher Zusammenhang besteht: Die β -Asp¹-Angiotensine sind am Blutdruck doppelt so wirksam wie die α -Asp¹-Angiotensin-II-Verbindungen und sind bei Inkubation in Rattenserum oder Humanplasma gegen abbauende Fermente («Angiotensinase») resistenter. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Aminopeptidase wesentlich am Abbau von Angiotensin II im Plasma beteiligt ist. Bei Inkubation in Rattennierenextrakt besteht hingegen bezüglich Abbaugeschwindigkeit vorwiegend eine Differenz zwischen dem Amid α -Asp¹(NH₂)-Angiotensin II (H) und den untereinander ungefähr gleichen restlichen Substanzen, die langsamer inaktiviert werden.

Summary. β -Asp¹-Angiotensin II had a more pronounced action on the blood pressure of nephrectomized rats than the corresponding α -compound. β -Asp¹-Angiotensins were more slowly destroyed by rat serum, rat kidney homogenate, and human plasma than α -compounds, especially α -Asp¹-Angiotensin II amide.

H. BRUNNER und D. REGOLI

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel (Schweiz), 6. August 1962.

«Angiotensinase»-Empfindlichkeit in Humanfrischplasma (Heparinzusatz). Angaben wie in Figur 2 und 3

Präparat	2 min	4 min	10 min	30 min	120 min
H	50%	41%	13%	—	—
A	—	—	42%	23%	11%
B	—	—	63%	51%	38%
C	—	—	81%	78%	57%

⁵ Herrn Dr. B. RINIKER danken wir für die chromatographischen Untersuchungen.

Studies on the Histopathological Changes Induced by DDT in the Liver, Kidney, and Intestine of certain Fishes

CAMERON and CHENG¹ stated that at present nothing is known about the action of DDT beyond the fact that it interferes in some way with the normal function of the nervous system. The study of histopathological changes in the tissues of fishes exposed to DDT is of great economic importance. Hence the author proposes to study the changes caused by DDT in the liver, kidney and intestine of fishes. The microscopic changes occur predominately in the liver of fishes, and consequently these have been described in greater detail.

Technique. The tissues were fixed in 10% formaline, Zenker-Helly, Bouin's fluid and Carnoy fixatives. The sections were cut at 6–8 μ and stained with Mallory triple, haematoxylin and eosin stains. No histopathological changes in the tissues similar to those of experimental fishes were noted in the fishes of the controlled experiments.

Observations. The pathological changes caused by DDT on different fishes and tissues are described below.

1. *The liver.* The histopathological changes in the liver include damage of liver cells, vacuolar degeneration of the cytoplasm of the cells, localised necrosis and parenchymatous degeneration of cells and hypertrophy of hepatic cells.

(a) *Ophiocephalus punctatus.* The hypertrophy of hepatic cells, necrosis and margination of cells were observed from DDT infected liver (Figure 2). The liver damage was indicated by a scattered distribution of parenchymatous cells. The principal lesion was the vacuolar degeneration of the cytoplasm of the cells. The hepatic cells were moderately vacuolated, the vacuoles being either small or large, and in certain cells these may be single or multiples. The central hepatic cells stained less deeply than the peripheral ones. The centralobular hypertrophy was well marked. In severely affected liver, the centre of the cells appeared empty. The cells of the periphery were more dense. There was slight displacement of the nucleus from its original central position. The lesion occurred more often in the central area than the peripheral area.

¹ G. R. CAMERON and K. K. CHENG, Brit. med. J. 2, 819 (1951).