

mimic the temperature effect for the induction of the new puffing pattern. Since a good deal of information is available on the chemical mechanisms by which these substances act, we may now study the metabolic variations that can induce the formation of these puffs¹⁸.

Riassunto. Si è notato che shocks di temperatura possono indurre una variazione di «puffing pattern» in ghiandole salivari di *Drosophila*. Tali «puffing» sono perfettamente reversibili e rappresentano zone di intensa sintesi

di RNA. Si è notato che DNP e Na salicilato portano a simili variazioni di «puffing pattern».

F. RITOSSA

Laboratorio Internazionale di Genetica e Biofisica, Napoli (Italy), July 6, 1962.

¹⁸ The author wishes to thank Dr. I. E. RASMUSSEN and Prof. G. MAGNI of the Genetics Institute of the University of Pavia for encouragement and critical discussion during the course of this work.

Über Korrelationen zwischen der Hemmung des aktiven Na-Transportes bei Erythrocyten und der positiv-inotropen Wirkung von Digitaliskörpern nach Phenylbutazonschädigung

SCHATZMANN¹, KAHN^{2,3}, SOLOMON et al.⁴, GLYNN⁵, MACHOVÁ⁶ und REPKE et al.⁷ zeigten, dass Digitaliskörper in niedrigen Konzentrationen den aktiven Ionentransport kältegeschädigter menschlicher Erythrocyten hemmen und dass diese Fähigkeit sich mit einigen Struktur-Wirkungsbeziehungen, mit den Toxizitätswerten und der Hemmung der für den Ionentransport verantwortlichen ATP-ase korrelieren lässt. Unbeantwortet blieb bisher die Frage, ob auch therapeutische Konzentrationen von Digitaliskörpern, die am isolierten Herzen einen positiv inotropen Effekt hervorrufen, den aktiven Kationentransport hemmen. In früheren Untersuchungen⁸⁻¹⁴ haben wir gezeigt, dass zwischen einer Reihe von Geninen und Glykosiden strukturabhängige qualitative Wirkungsunterschiede in dem Sinne bestehen, dass Konzentrationen, die am ungeschädigten isolierten Herzen einen äquieffektiven positiv inotropen Effekt hervorrufen, eine experimentell ausgelöste akute «Herzinsuffizienz» unterschiedlich stark kompensieren können. Als vorläufige Arbeitshypothese wurde die Vermutung ausgesprochen¹¹, dass eine verschiedene starke Hemmwirkung auf den aktiven Ionentransport und damit auf die von SKOU nachgewiesene ATP-ase für diese spezifischen Wirkungsdifferenzen verantwortlich sein könnte. In den vorliegenden Versuchen sollte diese Arbeitshypothese überprüft werden.

Methodisch hielten wir uns an die Literaturangaben von SCHATZMANN, KAHN et al.¹⁻³. Nach 4-5-tägiger Aufbewahrung des Blutes bei 4°C wurde nach Reinkubation bei 37°C die Abnahme des akkumulierten Natriums flammenphotometrisch gemessen. Die Hemmwirkung auf den Na-Austausch wurde mit 15 Geninen¹⁵, deren positiv inotroper Effekt am ungeschädigten und geschädigten isolierten Meerschweinchenvorhofpräparat festgestellt worden war¹¹⁻¹³, bestimmt. Die sich ergebenden Dosiswirkungskurven wurden statistisch nach der Kovarianzanalyse (BONNIER und TEDIN¹⁶) auf Parallelität und gemittelten mittleren Abstand überprüft. Für die in den pharmakologischen Versuchen am isolierten Vorhofpräparat gefundenen äquieffektiven Geninkonzentrationen wurde von den Dosiswirkungskurven die prozentuale Hemmwirkung auf den Na-Austausch abgelesen und eine Korrelation zwischen dieser Hemmungsstärke und der Stärke des positiv inotropen Effektes der Genine nach Chinin- und Phenylbutazonschädigung aufgestellt.

Die Strukturformeln der untersuchten 15 Genine sind in Tabelle I gegenübergestellt.

Ergebnisse. Entgegen den Befunden von KAHN^{2,3} und MACHOVÁ⁶, die für die Hemmung des aktiven Kalium-

transportes bei allen untersuchten Digitaliskörpern parallel verlaufende Dosiswirkungskurven feststellten, fanden wir für die Hemmung des Natrium-Austausches signifikante strukturabhängige Unterschiede einiger Regressionskoeffizienten. Die Dosiswirkungskurven der beiden 3,14-Dihydroxygenine (Digitoxigenin und Bufalin) verlaufen flacher als die Kurven der 3,14,12- und 3,14,16-Trihydroxygenine ($P > 0,02$). Die Substitution einer Aldehyd- statt der Methylgruppe in C₁₀ (Strophanthidin: Periplogenin) vermindert ebenfalls den Anstiegswinkel. Der Einfluss des Laktoneinges ist unterschiedlich: bei den 3,14,16-Trihydroxygeninen besitzen die drei Bufadienolide (Bufotalin, Desacetylbufotalin und Cinobufagin) höhere Regressionskoeffizienten als die beiden Cardenolide (Gitoxigenin und Oleandrigenin). Bei den 3,5,14-Trihydroxygeninen ist das umgekehrte Verhalten festzustellen (Figur 1). Setzt man ähnlich wie bei MACHOVÁ die ED₅₀-Werte der Dosiswirkungskurven zu den Toxizitätswerten bei der Katze in Beziehung, so ist der Korrelationskoeffizient hoch signifikant ($P < 0,001$).

In Tabelle II sind die Hemmung des aktiven Na-Austausches und die Kompensation nach Chinin- und Phenylbutazonschädigung durch die am ungeschädigten Herzen äquieffektiven Konzentrationen der Genine gegenübergestellt.

¹ H. J. SCHATZMANN, *Helv. physiol. Acta* **11**, 346 (1953).

² J. B. KAHN JR. und G. H. ACHESON, *J. Pharmacol.* **115**, 305 (1955).

³ J. B. KAHN JR., *J. Pharmacol.* **121**, 234 (1957).

⁴ A. K. SOLOMON, T. J. GILL und G. L. GOLD, *J. gen. Physiol.* **40**, 327 (1956), zit. nach ⁶.

⁵ J. M. GLYNN, *J. Physiol.* **136**, 148 (1957).

⁶ J. MACHOVÁ, *Exper.* **16**, 553 (1960).

⁷ K. REPKE und H. J. PORTIUS, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **241**, 535 (1961).

⁸ W. FÖRSTER, *Exper.* **17**, 220 (1961).

⁹ W. FÖRSTER, *Exper.* **17**, 308 (1961).

¹⁰ W. FÖRSTER, *Acta biol. med. germ. Suppl.* **1**, 165 (1961).

¹¹ W. FÖRSTER, *Habilitationsschrift*, Magdeburg (1961).

¹² W. FÖRSTER, *Acta biol. med. germ.*, im Druck (1962).

¹³ W. FÖRSTER, *Acta biol. med. germ.*, im Druck (1962).

¹⁴ W. SZIEGOLIT und W. FÖRSTER, *Acta biol. med. germ.* **7**, 614 (1961).

¹⁵ Die verwendeten Genine wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. K. MEYER, Basel (Desacetylbufotalin, Cinobufagin, Bufotalin, Telocinobufagin, Bufalin, Periplogenin und Oleandrigenin), Herrn Prof. TAMM, Basel (12 β -Hydroxybufalin), Herrn Prof. WOLLENBERGER, Berlin (Ouabagenin), Herrn Prof. THREN, AWD Dresden (Digoxigenin), Herrn Dr. DÜBLER, Deutsche Hoffmann-La Roche AG, Grenzach Baden, (Gitoxigenin und Digitoxigenin), Strophanthidin und Strophanthidol stammen von der Arco-Chemie, Berlin.

¹⁶ G. BONNIER und O. TEDIN, *Biologisk variationsanalys* (Stockholm 1940).

Tab. I. Strukturformeln der untersuchten Genine

| | |
|--|-----------------------------------|
| <div>Cardenolid</div> <div></div> | |
| <div>Bufadienolid</div> <div></div> | |
| 3, 14-Dihydroxy-10-Methyl: | Digitoxigenin (Cardenolid) |
| | Bufalin (Bufadienolid) |
| 3, 14, 5-Trihydroxy-10-Methyl: | Periplogenin (Cardenolid) |
| | Telocinobufagin (Bufadienolid) |
| 3, 5-Dihydroxy-14, 15-Epoxy-10-Methyl: | Marinobufagin (Bufadienolid) |
| 3, 14, 5-Trihydroxy-10-Aldehyd: | Strophanthidin (Cardenolid) |
| 3, 14, 5-Trihydroxy-10-Carbinol: | Strophanthidol (Cardenolid) |
| 3, 14, 12-Trihydroxy-10-Methyl: | Digoxigenin (Cardenolid) |
| | 12β-Hydroxybufalin (Bufadienolid) |
| 13, 14, 16-Trihydroxy-10-Methyl: | Gitoxigenin (Cardenolid) |
| | Desacetylbufotalin (Bufadienolid) |
| 3, 14-Dihydroxy-16-Acetoxy-10-Methyl: | Oleandrigenin (Cardenolid) |
| | Bufotalin (Bufadienolid) |
| 3-Hydroxy-14, 15-Epoxy-16-Acetoxy-10-Methyl: | Cinobufagin (Bufadienolid) |
| 1, 3, 5, 11α, 14-Pentahydroxy-10-Carbinol: | Ouabagenin (Cardenolid) |

Tab. II. Gegenüberstellung der Stärke der Hemmwirkung äqui-effektiver Konzentrationen der Genine auf den aktiven Na-Transport und der positiv inotropen Effekte nach Chinin- und Phenylbutazon-schädigung

| | Äqui-effektive Konzentrationen am isolierten Herzen g/ml | Na-Gehalt der Erythrocyten nach Reinkubation bei 37°C (Wärmewert = 0%, Kälte-wert = 100%) % | Positiv inotrope Wirkung nach Phenyl-butazon-schädi-gung % | Chinin-schädi-gung % |
|--------------------|--|---|--|----------------------|
| 12β-Hydroxybufalin | 5 · 10 ⁻⁷ | 158 | 83 | 32 |
| Digoxigenin | 2 · 10 ⁻⁶ | 144 | 52 | 11 |
| Strophanthidin | 2 · 10 ⁻⁶ | 95 | 23 | 13 |
| Gitoxigenin | 3 · 10 ⁻⁶ | 90 | 43 | 1 |
| Desacetylbufotalin | 1 · 10 ⁻⁷ | 83 | 73 | 8 |
| Strophanthidol | 8 · 10 ⁻⁷ | 74 | 30 | 30 |
| Ouabagenin | 5 · 10 ⁻⁷ | 72 | 28 | 3 |
| Cinobufagin | 1 · 10 ⁻⁷ | 65 | 32 | 6 |
| Oleandrigenin | 1 · 10 ⁻⁷ | 60 | 15 | -7 |
| Digitoxigenin | 3 · 10 ⁻⁷ | 58 | 51 | 7 |
| Bufotalin | 1 · 10 ⁻⁷ | 57 | 33 | 23 |
| Telocinobufagin | 5 · 10 ⁻⁸ | 51 | 32 | 27 |
| Marinobufagin | 1 · 10 ⁻⁶ | 39 | 24 | -2 |
| Periplogenin | 5 · 10 ⁻⁷ | 38 | 25 | 2 |
| Bufalin | 2 · 10 ⁻⁸ | 30 | 31 | 0 |

Aus Spalte 3 der Tabelle II ergibt sich, dass alle am Herzen positiv inotrop wirksamen Konzentrationen auch an menschlichen Erythrocyten den Ionenaustausch, wenn auch in unterschiedlicher Stärke, hemmen. Untersucht man die Beziehung zwischen der Ionenhemmwirkung und den positiv inotropen Genineffekten nach Herzschädigung,

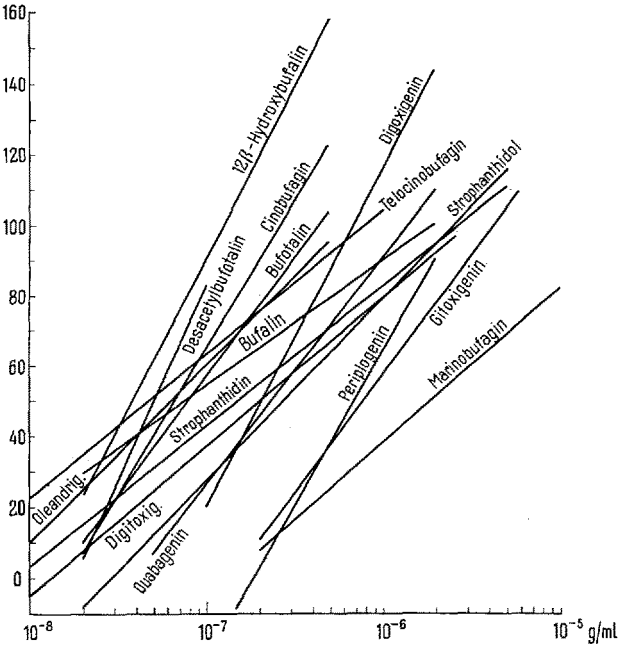


Fig. 1. Einfluss von 15 Geninen auf den aktiven Natriumtransport kältegeschädigter menschlicher Erythrocyten nach Reinkubation bei 37°C. Ordinate: Natriumgehalt der Erythrocyten nach Reinkubation bei 37°C (Wärmewert = 0%, Kältewert = 100%).

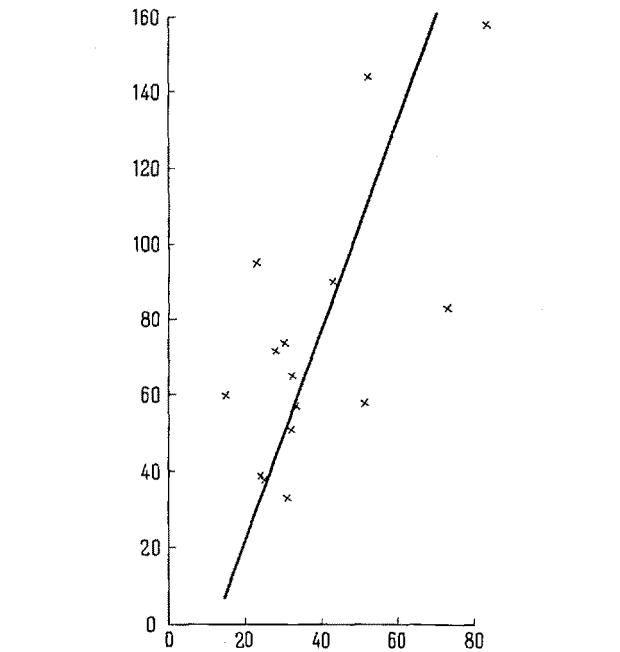


Fig. 2. Korrelation zwischen der Hemmwirkung auf den aktiven Natriumtransport bei Erythrocyten und dem positiv inotropen Effekt nach Phenylbutazonschädigung. Ordinate: Na-Gehalt der Erythrocyten in % nach äquieffektiven Konzentrationen der Genine (Wärmewert = 0%, Kältewert = 100%). Abszisse: Positiv inotroper Effekt nach Phenylbutazonschädigung in %.

so ergibt sich für die Chinineffekte keine Korrelation, für die Kompensation der Phenylbutazon-schädigung dagegen ist der Korrelationskoeffizient signifikant ($P < 0,01$). Die Regressionslinie ist in Figur 2 dargestellt.

Diskussion. Zusammenhänge zwischen der positiv inotropen Digitaliswirkung und intrazellulären Ionenveränderungen werden seit langem diskutiert (Literaturübersicht¹¹). Die von einigen Autoren nachgewiesene Abgabe intrazellulären K^+ wurde neuerdings durch Befunde von KLAUS, KUSCHINSKY und LÜLLMANN¹⁷ in Frage gestellt. Sie fanden durch therapeutische, positiv inotrop wirk-same Digitoxigenin-Konzentrationen eine etwa 20%ige Abnahme des intrazellulären Na-Gehaltes und parallel dazu eine etwa 30%ige Abnahme des Ca-Gehaltes. Sie folgern aus ihren Befunden, dass eine Hemmung des Ionen-transportes oder eine Abnahme des K^+ - und Na-Gradienten bei der Herzmuskelzelle nicht die Ursache für den therapeutischen Effekt der Herzglykoside sein kann, sondern nur mit toxischen Glykosidwirkungen korreliert ist. Demgegenüber zeigen unsere Befunde, dass die Hemmung des aktiven Ionen-transportes am Erythrocyten nicht nur mit den Toxizitätswerten, sondern auch mit den therapeutischen Effekten korreliert werden kann, und dass darüber hinaus diese Hemmwirkung die von uns nachgewiesenen Wirkungsunterschiede verschiedener Gennine und Glykoside nach Schädigung zu erklären gestattet. Bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener herzschädigender Verbindungen fanden wir¹¹ nach Phenylbutazon eine signifikante Zunahme des Na- und K-Gehaltes, die mit klinischen Berichten über eine verminderte Na-Ausscheidung im Urin übereinstimmt (Literatur bei RECHENBERG¹⁸). Nach Chinin dagegen kommt es zu einer Na-Abnahme bei gleichzeitiger K-Zunahme. Es ist daher verständlich, dass in unseren Versuchen die Hemmwir-

kung auf den Na-Transport nur mit den positiv inotropen Effekten nach Phenylbutazon-Schädigung korreliert war, nicht dagegen mit den Effekten nach Chinin. WILBRANDT^{19,20} vertritt die Auffassung, dass ein gemeinsames Carriersystem für Na^+ und Ca^{++} existiert und die Verschiebungen beider Ionen gleichsinnig erfolgen.

Für die Erklärung der Wirkungsunterschiede zwischen den Digitaliskörpern dürfte ursächlich ein unterschiedlicher Effekt auf den Calciumgehalt wahrscheinlicher sein, der jedoch an den gleichsinnigen Na-Veränderungen leichter zu messen ist²¹.

Summary. For therapeutic heart-equipotent concentrations of 15 genins, there is a correlation between the inhibition of the sodium transport in cold-stored red cells of man and the positive inotropic action on the isolated auricle preparation of the guinea pig, damaged by phenylbutazone.

W. FÖRSTER und W. SZIEGOLEIT

Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie, Magdeburg (Ostdeutschland), 25. Juni 1962.

¹⁷ W. KLAUS, G. KUSCHINSKY und H. LÜLLMANN, Arch. exp. Path. Pharmacol. **242**, 480 (1962).

¹⁸ H. K. VON RECHENBERG, Butazolidin (Thieme Verlag, Stuttgart 1961).

¹⁹ W. WILBRANDT, Wiener Med. Wschr. **108**, 809 (1958).

²⁰ W. WILBRANDT, Schweiz. Med. Wschr. **85**, 315 (1955).

²¹ Herrn D. SCHNEIDER danken wir für seine gewissenhafte und verständnisvolle Mitarbeit.

Acid-Soluble Purine and Pyrimidine Compounds of Mammalian Spermatozoa

Studies on the free nucleotides and related compounds of small molecular weight contained in spermatozoa have been so far confined to bull¹⁻⁵, ram^{3,6}, boar⁶ and sea-urchin spermatozoa^{7,8}. In this communication, we report the results of estimations, carried out as described earlier⁴, of the intracellular pool of free nucleotides and related compounds in the semen of goat, buffalo and several indigenous breeds of bull.

Several workers have shown the presence of a sizable pool of adenosine triphosphate (ATP) in bull^{1-3,5}, ram^{3,6}, boar⁶, and sea-urchin^{7,8} spermatozoa, and of adenine di- and monophosphates (ADP and AMP, respectively) in bull⁵ and sea-urchin⁸ spermatozoa; the acid-soluble fraction of bull spermatozoa has also been reported to contain inosine and inosinic acid⁵. The presence of a pool of acid-soluble guanine, cytosine, uracil, or/and thymine derivatives in spermatozoa has, however, not been reported so far, except in the case of sea-urchin spermatozoa⁸, which have been shown to contain almost half as much uridine triphosphate (which, according to the author, may have contained some guanosine triphosphate) as ATP. Since bull and buffalo spermatozoa have been shown to synthesize ribonucleic acid (RNA)⁹, it seemed to be of interest to determine if the normal complement of free nucleotides is present in bovine spermatozoa. Mammalian spermatozoa will be expected to contain the triphosphates of cytosine and guanosine in

addition to ATP¹⁰, also in view of their ability to incorporate radioactive amino acids into their proteins^{9,11-14}. In this communication, we also show that bull and buffalo spermatozoa contain significant amounts of acid-soluble derivatives of adenosine, guanosine and cytosine; uracil and thymine derivatives are not present, except perhaps in traces.

Materials and Methods. The semen was obtained from 3 bulls (Kerry, Deoni and Hanuman breeds), a buffalo

¹ H. A. LARDY and P. H. PHILIPS, J. biol. Chem. **148**, 343 (1943).

² H. A. LARDY, H. G. HANSEN, and P. H. PHILIPS, Arch. Biochem. **6**, 41 (1945).

³ T. MANN, Biochem. J. **39**, 451 (1945).

⁴ P. M. BHARGAVA, M. W. H. BISHOP, and T. S. WORK, Biochem. J. **73**, 242 (1959).

⁵ A. A. NEWTON and Lord ROTHSCILD, Proc. Roy. Soc. B **155**, 183 (1961).

⁶ I. I. IVANOV, B. S. KASSAVINA, and L. D. FOMENKO, Nature **158**, 624 (1946).

⁷ Lord ROTHSCILD and T. MANN, Nature **166**, 781 (1950).

⁸ T. HULTIN, Exp. Cell Res. **14**, 633 (1958).

⁹ K. A. ABRAHAM and P. M. BHARGAVA, Biochem. J., in press.

¹⁰ M. HOAGLAND, Proc. Fourth Intern. Congr. Biochem., Vienna (1958), vol. 8, p. 199.

¹¹ P. M. BHARGAVA, Nature **179**, 1120 (1957).

¹² P. M. BHARGAVA, Proc. Fourth Intern. Congr. Biochem., Vienna (1958), vol. 8, p. 194.

¹³ P. M. BHARGAVA, M. W. H. BISHOP, and T. S. WORK, Biochem. J. **73**, 247 (1959).

¹⁴ F. MARTIN and J. BRACHET, Exp. Cell Res. **17**, 399 (1959).