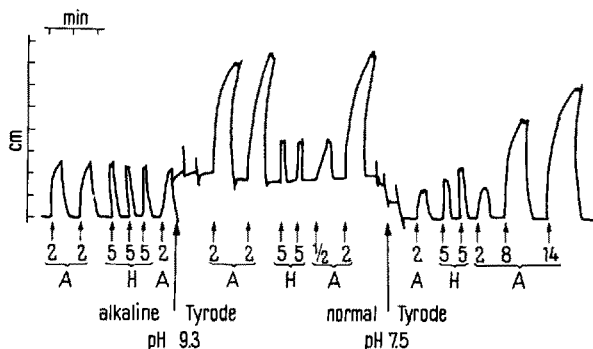


Potential of Angiotensin Action on Smooth Muscle by Alkaline pH

PALADINI et al.¹ have recently shown that the pressor activity of angiotensin is considerably increased when it is injected into the assay animals (50 g, white rats) at a pH ≥ 11 . This phenomenon was tentatively attributed to a change in conformation of the molecule of angiotensin, since other possible explanations were experimentally discarded.

We have been able to demonstrate a similar potentiating effect of the alkaline pH on the stimulating action of angiotensin on smooth muscle (Figure).

From the tracings in the Figure it can easily be seen that the contractions of the ileon provoked by angiotensin, are increased four-fold, or more, when the pH of the medium is increased from 7.5 to 9.3. The potentiation occurs rapidly after the change in pH and is completely reversible. The response of the muscle to histamine is unaffected by the pH changes.



Volume of the bath, 3 ml; temperature, 35°C. At the first arrow normal Tyrode (pH 7.5) was replaced by a Tyrode with 400 mg/l of sodium carbonate (pH 9.3). At the second arrow the original Tyrode was used again. A: angiotensin (Val¹angiotensin II, β aspartylamide, synthetic²); H: histamine dihydrochloride. The numbers indicate the nanograms.

When the pH of the Tyrode is raised above 9.3 the tonus of the ileon increases excessively and the preparation is no longer useful. On the other hand, at pH lower than 9.0, the potentiated response is not observed. Sodium carbonate can be replaced by sodium hydroxide, but the tonus of the muscle increases more with the latter.

The best preparation to demonstrate this effect is the guinea-pig's ileon, but it can also be clearly observed with the uterus and duodenum of the rat.

Bradykinin, oxytocin, and 5-hydroxytryptamine are, like histamine, not potentiated by similar increases in pH.

Evidence obtained by differential ultraviolet spectroscopy of angiotensin against an equimolar mixture of its constituent amino acids shows that the conformation of the polypeptide probably changes with rising pH: a pronounced peak of absorption appears at 250 m μ when the pH is 10 or higher¹. More detailed studies have now shown that significant changes in the spectra can be demonstrated already at pH 9.4. This observation correlates very well with the results of the present experiments and supports the hypothesis advanced by PALADINI et al.¹ to explain these potentiation phenomena³.

Zusammenfassung. Die Potenzierung der Wirkung von Angiotensin auf das isolierte Meerschweinchen-Ileon wird bewiesen, wenn das Tyrodebad auf pH 9,3 alkalisiert ist. Diese Potenzierung wird mit Bradykinin, Oxytocin, 5-Hydroxytryptamin und Histamin nicht beobachtet.

H. V. HUIDOBRO and A. C. PALADINI

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires (Argentina), August 22, 1963.

¹ A. C. PALADINI, A. E. DELIUS, and M. T. FRANZE DE FERNÁNDEZ, *Biochem. biophys. Acta* 74, 168 (1963).

² Generously supplied by Ciba Ltd. Basel (Switzerland).

³ This investigation has been supported in part by the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina and the National Institutes of Health, U.S. Public Health Service (Grant No. HE-05153-03).

Effets de l'actinomycine D sur le développement normal et sur les modifications expérimentales de la morphogénèse de l'oeuf de l'oursin

Paracentrotus lividus

L'actinomycine D se fixe sur l'acide désoxyribonucléique¹ et inhibe les synthèses nucléaires d'acides ribonucléiques dépendantes de l'acide désoxyribonucléique². L'actinomycine D constitue ainsi un agent précieux pour l'étude du contrôle exercé par les noyaux sur la différenciation cellulaire. Chez l'oursin l'actinomycine D ralentit l'incorporation de la thymidine marquée dans l'acide désoxyribonucléique et arrête, peu après la fécondation, le renouvellement de l'acide ribonucléique³.

Dans cette note nous étudierons les effets de l'actinomycine D sur le développement normal des larves et sur ses modifications expérimentales, l'animalisation et la végétalisation.

Les oeufs sont mis 30 min après la fécondation dans l'eau de mer contenant de 5 à 40 μ g par ml d'actinomycine D. Une partie des oeufs est cultivée en permanence en

présence d'actinomycine, l'autre partie étant reportée, après 20 h de traitement, dans l'eau de mer normale. La végétalisation est obtenue en traitant les oeufs pendant 20 h par le chlorure de lithium ($1, 3 \times 10^{-2} M$). L'animalisation est provoquée en traitant les oeufs pendant la même durée par le chlorure de zinc ($5 \times 10^{-6} M$) ou par le bleu d'Evans ($2 \times 10^{-4} M$). Les cultures sont faites à l'obscurité à la température du laboratoire.

Résultats. Avec l'actinomycine D (30 à 40 μ g par ml) la segmentation se déroule, au début du développement, à la même allure que chez les témoins; elle se ralentit sensiblement au stade morule avancé. Le développement s'arrête au stade blastula jeune. Le report dans l'eau de mer normale n'améliore pas le développement de ces larves. Avec

¹ J. M. KIRK, *Biochim. biophys. Acta* 42, 167 (1960).

² E. REICH, R. M. FRANKLIN, A. J. SHATKIN et E. L. TATUM, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 48, 1238 (1962).

³ P. R. GROSS et G. COUSINEAU, *Fed. Proc.* 22, 106 (1963).

l'abaissement de la concentration le développement, toujours ralenti, progresse davantage; le stade blastula avancé est atteint avec 20 μg par ml; la gastrulation est ébauchée chez quelques larves avec 10 μg par ml. Enfin, avec 5 μg par ml, le stade gastrula asymétrique est atteint. Toutes ces larves dégénèrent rapidement. Le report dans l'eau de mer améliore légèrement le développement des larves traitées par des concentrations de 5 et 10 μg par ml.

Les larves traitées au stade blastula mésenchyme par l'actinomycine (40, 30 et 20 μg par ml) cessent de se développer et se lysent en quelques heures. Plusieurs travaux^{4,5} ont montré que l'addition d'acide désoxyribonucléique au milieu protège les organismes contre les effets de l'actinomycine D. Chez l'oursin nous avons observé que l'acide désoxyribonucléique ajouté au milieu de culture à raison de 500 μg par ml protège les larves contre les effets inhibiteurs de l'actinomycine (10 μg par ml).

Les oeufs traités simultanément par le chlorure de lithium et l'actinomycine (10 μg par ml) forment, après leur report dans l'eau de mer, des larves plus fortement végétalisées que les larves traitées par le chlorure de lithium seul. En contraste, les effets animalisants des ions zinc et du bleu d'Evans apparaissent diminués dans les larves traitées simultanément par ces agents et l'actinomycine (10 μg par ml). En effet, l'extension de l'épaississement ectodermique apical et de la touffe ciliée qui le recouvre sont toujours moins importants dans ces larves que dans celles traitées par le chlorure de zinc ou le bleu d'Evans.

Conclusions. Les résultats obtenus montrent que l'actinomycine D, sans influence notable sur la segmentation aux concentrations utilisées, arrête le développement au stade blastula. L'arrêt du développement à ce stade peut être obtenu en faisant agir l'actinomycine directement sur les blastulas. Ces données indiquent que les stades ultérieurs du développement, c'est à dire la gastrulation et la différenciation des pluteus, sont étroitement liés au fonctionnement du noyau ou plus précisément aux réactions de synthèses inhibées par l'actinomycine. Or cet agent inhibe les synthèses d'acide ribonucléique gouvernées par l'acide désoxyribonucléique et, notamment, la formation des messagers qui assurent le transfert de l'information génétique aux ribosomes où sont élaborées les protéines spécifiques. L'action inhibitrice de l'actinomy-

cine sur la différenciation montre la relation de dépendance existante entre la différenciation et les synthèses d'acide ribonucléique nucléaire; cette inhibition de la différenciation porte à la fois sur les structures ectodermiques et entomésodermiques et aucune modification de la détermination embryonnaire n'est provoquée par l'actinomycine seule. Cependant, en examinant les effets de faibles concentrations d'actinomycine sur des larves traitées par des agents animalisants ou végétalisants, on observe que cet agent favorise la végétalisation alors qu'il diminue l'expression de l'animalisation. Ces observations suggèrent l'existence d'une différence dans l'état de dépendance vis à vis du noyau des processus de différenciation ectodermique et entomésodermique.

Summary. In the presence of actinomycin D (20-40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), the development of the eggs of the sea urchin, *Paracentrotus lividus*, is slowed from the late morula and stopped at the blastula stage. The development is immediately stopped in the blastula treated with actinomycin D (20-40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The inhibitory effects of actinomycin D are prevented by deoxyribonucleic acid. Actinomycin D does not exert animalizing or vegetalizing effects. However, the enhancing of vegetalizing action of lithium and the weakening of animalizing effects of zinc ions and Evans blue have been observed in the presence of actinomycin D. These observations may reflect some difference in the state of dependence of differentiation of entomesodermic and ectodermic structures towards the nucleus⁶.

R. LALLIER

Station Zoologique, Villefranche-sur-Mer (France),
le 20 juin 1963.

⁴ G. P. WHEELER et L. L. BENNETT JR, *Biochem. Pharm.* 11, 353 (1962).

⁵ W. KERSTEN, H. KERSTEN et H. M. RAUEN, *Nature* 187, 60 (1960).

⁶ **Remerciements.** L'actinomycine D est un don du Docteur M. GRUNBERG-MANAGO (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris) à qui j'exprime mes remerciements.

Effect of α -Methyl-DOPA on Myocardial Catecholamines

Studies in recent years have added considerably to our knowledge about the mechanism of action of noradrenaline (NA) release produced by α -methyl-amino acids. Conflicting results indicate, however, that this mechanism is not yet entirely elucidated.

SMITH¹ reported that the administration of α -methyl-DOPA (α -M-DOPA) caused a decrease in brain serotonin but left the NA level unchanged. NA was estimated by means of bioassay. In contrast, it has been subsequently demonstrated by many investigators (i.e. CARLSSON and LINDQVIST², HESS et al.³, PORTER et al.⁴) that α -M-DOPA depresses also the levels of NA in the brain as well as in other tissues. In these experiments a fluorimetric method of NA estimation was used.

It has also been demonstrated that α -M-DOPA and its analogue lacking the *para*-OH group, α -methyl-*meta*-tyrosine (α -MMT), undergo decarboxylation and subsequent β -hydroxylation *in vivo*, and that the amines thus formed

(α -methyl-dopamine and α -methyl-noradrenaline, resp. α -methyl-*meta*-tyramine and α -methyl- β -hydroxy-*meta*-tyramine) may be taken up by the tissues; while α -methyl-dopamine was shown to disappear almost completely from the brain 24 h after α -M-DOPA administration, α -methyl-noradrenaline (α -M-NA) seemed to be retained for a longer time³. Recent studies of CARLSSON⁵ showed that α -methyl- β -hydroxy-*meta*-tyramine (metaraminol) was found in the brain of rabbits as late as 7 days after the administration of a single dose of α -MMT (100 mg/kg, i.v.). According to CARLSSON, the amines formed from α -methylamino acids would thus displace their physiological analogues

¹ S. E. SMITH, *Brit. J. Pharmacol.* 15, 319 (1960).

² A. CARLSSON and M. LINDQVIST, *Acta physiol. scand.* 54, 87 (1962).

³ S. M. HESS, R. H. CONNAMACHER, M. OZAKI, and S. UDENFRIEND, *J. Pharmacol. exp. Therap.* 134, 129 (1961).

⁴ C. C. PORTER, J. A. TOTARO, and C. M. LEBBY, *J. Pharmacol. exp. Therap.* 134, 139 (1961).

⁵ A. CARLSSON, to be published in *Progress in Brain Research* (1963).