

generally, in the synthesis of C<sub>1</sub> compounds<sup>9,10</sup> still remains to be demonstrated<sup>11</sup>, it follows that the increase of RNA turnover is to be tentatively interpreted on the basis of an indirect action of the vitamin.

Pantothenic acid might increase liver RNA turnover through its action on carbohydrate and lipid metabolism. In fact, it has been shown that the total number of phosphorus atoms incorporated into RNA is increased by raising energy intake in the diet<sup>12</sup>. This is in agreement with the *in vitro* studies of HENDERSON and LEPAGE<sup>13</sup> on the necessity of glucose as a source of energy for purine synthesis.

**Riassunto.** È stato studiato nel ratto mantenuto a dieta carente di acido pantotenico l'effetto della somministrazione dietetica della vitamina sul contenuto ed il turnover degli acidi nucleinici del fegato. L'acido pantotenico non influenza il contenuto degli acidi nucleinici e l'incorporazione del P<sup>32</sup> nel DNA, mentre provoca un aumento del-

l'incorporazione del P<sup>32</sup> nell'RNA, interpretato come un'azione indiretta della vitamina.

P. PUDDU, R. BUDINI,  
and C. M. CALDARERA

Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Bologna  
(Italy), August 6, 1964.

- <sup>9</sup> L. JAENICKE and E. BRODE, Biochem. Z. 334, 108 (1961).
- <sup>10</sup> H. NAKAGAWA, F. SUZUKI, and Y. TAKEDA, J. Biochem. (Tokyo) 49, 191 (1961).
- <sup>11</sup> W. S. SLY and E. R. STADTMAN, J. biol. Chem. 238, 2639 (1963).
- <sup>12</sup> H. N. MUNRO, D. J. NAISMITH, and T. W. WIKRAMANAYAKE, Biochem. J. 54, 198 (1953).
- <sup>13</sup> J. E. HENDERSON and G. A. LEPAGE, J. biol. Chem. 234, 2364 (1959).

## Über die Freisetzung von Katecholaminen durch Thrombin

Nachdem wir in vorangegangenen Arbeiten<sup>1,2</sup> die durch Thrombin ausgelöste Serotoninabgabe aus den Blutplättchen untersucht hatten, versuchten wir die Frage zu klären, ob das Gerinnungsferment Thrombin auch an anderen Objekten eine Freisetzung biogener Amine bewirken kann. Die pharmakologische Analyse der positiv inotropen Wirkung des Thrombins am isolierten Froschherzen<sup>3</sup> hatte bereits zu der Vermutung geführt, dass diese Thrombinwirkung über eine Freisetzung von Katecholaminen aus dem chromaffinen Gewebe zustande kommen könnte.

Wir haben daher geprüft, welchen Einfluss das Thrombin auf die Aminabgabe aus der isoliert durchströmten Nebenniere hat. Zu diesem Zweck wurden frisch präparierte Rindernebennieren nach dem von SCHÜMANN et al.<sup>4</sup> beschriebenen Verfahren mit sauerstoffgesättigter Tyrodelösung unter einem Druck von 40 cm H<sub>2</sub>O-Säule bei 37°C retrograd durchströmt. Das aus einer etwa 2 mm tiefen Incision ausfliessende Perfusat (durchschnittlich 1 ml/min) wurde jeweils 10 min lang gesammelt und zur Eiweißfällung mit 3,5% konzentrierter Perchlorsäure versetzt. Nach Abzentrifugieren des Niederschlages wurde die Lösung mit 10%iger K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung auf pH 6,0 gebracht und der Gehalt an Katecholaminen kolorimetrisch nach der Methode von EULER und HAMBERG<sup>5</sup> gemessen. Nachdem die Spontanfreisetzung in einer Vorlaufperiode bestimmt worden war, wurde 10 min lang mit einer thrombinhaltigen Tyrodelösung durchströmt und danach die Durchströmung wieder mit normaler Tyrodelösung fortgesetzt. Als Thrombinpräparat wurde hochgereinigtes Rinderthrombin, gewonnen nach SEEVERS<sup>6</sup>, mit einer spezifischen Aktivität von 2100 NIH-E/mg verwandt. Das Ergebnis der Versuche ist in der Figur zusammengefasst.

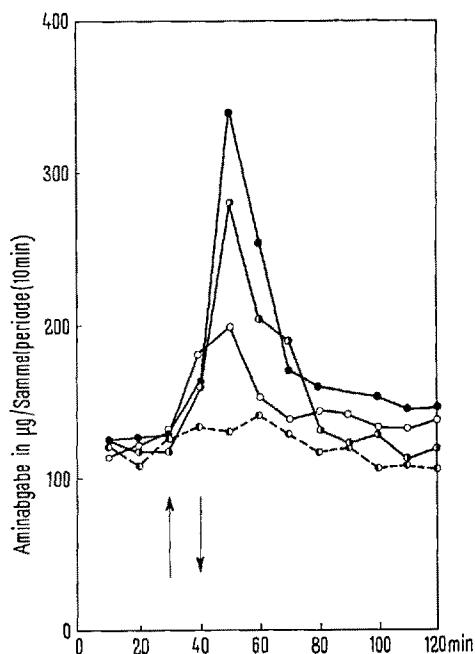
Demnach kommt es bereits nach vorübergehender Durchströmung mit 100 NIH-E Thrombin/ml zu einem deutlichen Anstieg der Katecholaminabgabe aus der Nebenniere. Bei Erhöhung der Thrombinkonzentration

auf 300 NIH-E/ml erreicht die Aminabgabe das Dreifache der Ruhefreisetzung. Die Inaktivierung des Fermentes durch Bindung an den spezifischen Thrombininhibitor Hirudin<sup>7</sup> hatte auch eine Blockade der aminfreisetzenden Wirkung des Thrombins zur Folge.

Von den zum Vergleich geprüften proteolytischen Enzymen Trypsin, Chymotrypsin, Papain und Plasmin hatte nur das Trypsin in einer Konzentration von 0,5 mg krist. Trypsin/ml eine gleichartige Wirkung.

Wir haben ferner untersucht, ob durch Einwirkung von Thrombin auf die isolierten Granula des Nebennierenmarks vom Rind eine Freisetzung von Katecholaminen ausgelöst wird. Die Isolierung und Inkubation der Granula sowie die Bestimmung der Adrenalin- und Noradrenalin-abgabe erfolgte nach der von SCHÜMANN und WEIGMANN<sup>8</sup> beschriebenen Methode. Im Gegensatz zu den Versuchen an der Nebenniere bewirkte Thrombin keine signifikante Erhöhung der Aminabgabe aus den in calciumfreier und calciumhaltiger Lösung suspendierten chromaffinen Granula des Nebennierenmarks. Auch die Erhöhung der Thrombinkonzentration auf 500 NIH-E/ml brachte keine Änderung des Ergebnisses. Der Angriffspunkt für die aminfreisetzende Wirkung des Thrombins kann demnach

- <sup>1</sup> F. MARKWARDT und W. BARTHÉL, Arch. exp. Path. Pharmak. 249, 176 (1964).
- <sup>2</sup> F. MARKWARDT, W. BARTHÉL und A. HOFFMANN, Naturwissenschaften, im Druck.
- <sup>3</sup> F. MARKWARDT, K.-O. HAUSTEIN und W. NUERNBERGK, Thrombos. Diathes. haemorrh. 12, 262 (1964).
- <sup>4</sup> H. W. HAAG, A. PHILIPPU und H. J. SCHÜMANN, Exper. 17, 187 (1961).
- <sup>5</sup> U. S. v. EULER und U. HAMBERG, Acta physiol. scand. 19, 74 (1949).
- <sup>6</sup> W. H. SEEVERS, W. G. LEVINE und R. S. SHEPPARD, Canad. J. Biochem. 36, 603 (1958).
- <sup>7</sup> F. MARKWARDT, *Blutgerinnungshemmende Wirkstoffe aus blutsaugenden Tieren* (VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1963).
- <sup>8</sup> H. J. SCHÜMANN und E. WEIGMANN, Arch. exp. Path. Pharmak. 240, 275 (1960).



Abgabe von Katecholaminen aus der isoliert durchströmten Rindernebenniere. Beginn ↑ und Ende ↓ der Durchströmung mit thrombinhaltiger Tyrodelösung. Bei ○—○ mit 100 NIH-E, bei ●—● mit 200 NIH-E, bei □—□ mit 300 NIH-E Thrombin/ml und bei ▲—▲ = 200 NIH-E Thrombin + 30 µg Hirudin/ml.

nicht an den granulären Aminspeichern liegen, sondern ist vermutlich an den Membranen der aminhaltigen Zellen zu suchen.

Wie die vorliegenden Versuche zeigen, ist die durch Thrombin ausgelöste Freisetzung biogener Amine nicht auf die Blutplättchen beschränkt. Es werden sich voraussichtlich noch weitere Objekte finden, an denen sich diese Wirkung des Fermentes nachweisen und studieren lässt. Für die Frage nach dem der aminfreisetzenden Wirkung des Thrombins zugrunde liegenden Mechanismus ist von Bedeutung, dass diese Wirkung an die spezifische proteolytische Aktivität des Fermentes geknüpft ist, die bekanntlich in der Spaltung bestimmter Peptidbindungen beruht. Die Aminfreisetzung könnte daher durch Reaktion des Thrombins mit einem proteinartigen Substrat an der Oberfläche der aminhaltigen Zellen eingeleitet werden.

**Summary.** Experiments on isolated perfused suprarenals have shown that the injection of thrombin caused a significant rise in the liberation of catechol amines. The specific thrombin-inhibitor, Hirudin, was able to abolish the thrombin effect. When isolated medullary granules from suprarenals were incubated with thrombin, no increase of catechol amine release was observed.

F. MARKWARDT und W. NUERNBERGK

*Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie Erfurt (DDR), 21. Oktober 1964.*

### Effect of Win 18501-2 on the Content of Catecholamines and the Number of Catecholamine-Containing Granules in the Rabbit Hypothalamus

It is well established that reserpine causes sedation with concomitant loss of serotonin, norepinephrine, and dopamine from the nervous tissues<sup>1-6</sup>. SPECTOR et al. have reported that Win 18501-2 (Oxypertin, 1-(5,6-dimethoxy-2-methyl-3-indole)-ethyl-4-phenylpiperazine) also produced sedation accompanied by the loss of norepinephrine without affecting serotonin content in the brain<sup>6</sup>. MATSUOKA has also reported that Win 18501-2 depleted only norepinephrine without loss of dopamine, suggesting that sedative effect of the drug is closely related to loss of brain norepinephrine<sup>7</sup>. The present study was undertaken on the rabbit hypothalamus better to understand the effect of Win 18501-2, both by biochemical and electronmicroscopic techniques.

By electronmicroscopy, DE IRALDI et al. demonstrated the existence of a large number of granulated vesicles supposed to be the site of storage of norepinephrine in the synapses of the anterior hypothalamus<sup>8</sup>. SHIMIZU and ISHII have demonstrated that the number of the granulated vesicles decreased markedly in the anterior hypothalamus after reserpine injection<sup>9</sup>. DE IRALDI et al. showed the complete disappearance of the granulated vesicles in the pineal body after reserpine injection<sup>10</sup>.

These studies might lead to the conclusion that norepinephrin is contained in the granulated vesicles. However, it is undecided whether or not other important amines, such as serotonin and dopamine, might also be contained within the granulated vesicles.

As shown in the Table, Win 18501-2 (70 mg/kg, intra-peritoneal injection) caused a decrease in norepinephrine content and in the number of granulated vesicles, whereas an increase in dopamine content in the rabbit hypothalamus, 3 h after a single injection, was observed when the

- <sup>1</sup> P. A. SHORE, P. PLETSCHER, E. G. TOMICH, A. CARLSSON, R. KUNTZMAN, and B. B. BRODIE, Ann. New York Acad. Sci. 66, 609 (1957).
- <sup>2</sup> B. B. BRODIE, J. S. OLIN, R. G. KUNTZMAN, and P. A. SHORE, Science 125, 1293 (1957).
- <sup>3</sup> A. CARLSSON, E. ROSENGREN, A. BERTLER, and J. NILSSON, *Psychotropic Drugs* (Ed.: S. GARATTINI and V. GHETTI, Milano 1957), p. 363.
- <sup>4</sup> A. BERTLER and E. ROSENGREN, Exper. 15, 10 (1959).
- <sup>5</sup> L. S. SEIDEN and A. CARLSSON, Psychopharmacologia 5, 178 (1964).
- <sup>6</sup> S. SPECTOR, K. MELMON, and S. SJOERDSMA, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 111, 79 (1962).
- <sup>7</sup> M. MATSUOKA, Jap. J. Pharmacol. 14, 181 (1964).
- <sup>8</sup> A. P. DE IRALDI, H. F. DUGGAN, and E. DE ROBERTIS, Anat. Rec. 145, 521 (1963).
- <sup>9</sup> N. SHIMIZU and S. ISHII, Arch. Hist. Jap. 24, 489 (1964).
- <sup>10</sup> A. P. DE IRALDI and E. DE ROBERTIS, Exper. 17, 122 (1961).