

main cause of the effect of ostruthin. An antibacterial effect is also shown by osthol (3) containing methoxyl and an unsaturated side chain consisting of five C atoms. The mere presence of the isoprenic side chain consisting of fifteen C atoms and being etherically bound on a coumarin molecule (umbelliprenin 6) fails to show any inhibitory effect.

In contrast to ostruthin, the retaining of free -OH groups is necessary for the effect of ammosesinol (7). Their acetylation results in a marked decrease of its effect (8), their methylation resulting in a complete nullification of the effect (9). An important role is probably that played by hydroxyl on the fourth carbon, as can be seen from the effect of dicoumarol (10).

The effect of natural coumarins on Gram-positive microorganisms

Micro-organism	Derivative (conc. $5 \cdot 10^{-3} M$)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>S. aureus</i>										
NCTC 8532	0	0	(+)	++	(+)	0	++	(+)	0	+
BS 270	0	0	(+)	++	0	0	++	(+)	0	+
<i>M. luteus</i>										
ATCC 398	0	0	(+)	++	+	0	+	(+)	0	+
BS 852	0	0	+	++	+	0	++	(+)	0	+
BS 1682	0	0	(+)	++	+	0	++	+	0	+
<i>M. lysodeicticus</i>										
ATCC 4698	0	0	(+)	++	+	0	+	(+)	(+)	+
ATCC 12698	0	0	(+)	++	+	0	+	+	0	++
NCTC 2665	0	0	(+)	++	++	0	+	(+)	0	+
NCTC 7011	0	0	(+)	++	+	0	++	(+)	0	++
<i>Bac. megatherium</i>										
M	0	0	+	++	++	0	++	(+)	0	++

++ = inhibition zones clear, with clear-cut demarcation; + = inhibition zones with indistinct demarcation; (+) = inhibition zones dull, partly outgrown.

The quantitative evaluation of the effect expressed in terms of the lowest effective concentration in the plate test has shown that ammosesinol is the most effective derivative. In *S. aureus* NCTC 8532 it causes marked inhibition in a concentration of $1 \cdot 10^{-4} M$ and is 2.5 times as effective as ostruthin and dicoumarol. On *M. luteus* BS 852, *M. lysodeicticus* ATCC 12698, NCTC 7011 and *S. aureus* BS 270, ammosesinol is effective up to $5 \cdot 10^{-5} M$ and is five times as effective in these cases as ostruthin and dicoumarol. *Bac. megatherium* is affected by ammosesinol up to $2.5 \cdot 10^{-5} M$ and the latter is four times as effective as ostruthin and dicoumarol.

The testing of ostruthin, ammosesinol and dicoumarol in a mixture with a double surplus of vitamin K₁ (phyloquinone), K₂ (farnoquinone), and K₃ (menadiol soluble) has shown that it is only vitamin K₂ that partly reduces the effect of ostruthin in all the strains tested with the exception of *Bac. megatherium*. The antagonistic effect of vitamin K₂ on ammosesinol was even weaker than that on ostruthin. In the case of dicoumarol, its inhibitory effect in a mixture with the above vitamins remained the same.

The selective effect of natural coumarins indicates an effect of the latter substances on metabolic processes in Gram-positive bacteria. It is possible that vitamin K₂ may be involved in these processes⁶.

Zusammenfassung. Von 15 untersuchten natürlichen Cumarinen und Furocumarinen besitzen Ammosesinol und Ostruthin stärkste Wirkung auf Gram-positive Mikroorganismen. Zur Ammosesinolwirkung ist die Erhaltung der freien -OH-Gruppen notwendig, während bei Ostruthin durch Vitamin K₂ die Wirksamkeit vermindert wird.

V. DADÁK and K. HOĐÁK

Department of Biochemistry and Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University J. E. Purkyně, Brno (Czechoslovakia), January 7, 1965.

⁶ D. H. L. BISHOP and H. K. KING, Biochem. J. 85, 550 (1962).

⁷ The authors wish to thank Mrs. M. KAZDOVÁ for her technical assistance.

Über die Abhängigkeit der Acetylcholinwirkung von der äusseren Ca-Konzentration bei isolierten MeerschweinchenVorhöfen

Die wesentliche Wirkung von Acetylcholin (ACh) am Herzen wird heute in einer spezifischen Erhöhung der Membranpermeabilität für K-Ionen gesehen¹. Die Folge davon ist eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer, die ihrerseits für die negativ inotrope Wirkung von ACh verantwortlich gemacht wird. HODITZ und LÜLLMANN² und GROSSMAN und FURCHGOTT³ konnten zeigen, dass der ⁴⁵Ca-Umsatz von elektrisch gereizten Meerschweinchen-Vorhöfen durch ACh vermindert wird. Diese Autoren nehmen daher an, dass infolge der verkürzten Aktionspotentialdauer die für die Auslösung der Kontraktion notwendige Ca-Ionenkonzentration im Zellinneren während der Erregung nicht erreicht wird. Durch die vorliegenden Versuche soll gezeigt werden, dass Veränderung der extrazellulären Ca-Konzentration ([Ca]_e) die negativ inotrope Wirkung von ACh beeinflusst.

Die Versuche wurden an isolierten, elektrisch gereizten (160/min) linken MeerschweinchenVorhöfen durchgeführt. In einer Versuchsserie wurden die Kontraktionen der Vorhofpräparate auf einem Russkymographion isotonisch registriert. Hierbei wurde ACh der Badlösung zugesetzt, so dass Endkonzentrationen von 10^{-8} , 10^{-7} und 10^{-6} g/ml resultierten. Die Einwirkungs-dauer der Substanz betrug 10 min. In einer zweiten Versuchsserie wurde die Kontraktionskraft der Vorhöfe über eine Transducerröhre (RCA 5734) isometrisch registriert, gleichzeitig wurden Ruhe- und Aktionspotentiale mit Glasmikroelektroden intrazellulär abgeleitet. ACh wurde 10 min lang mit konstanter Geschwindigkeit in das Organbad infundiert. Als

¹ W. TRAUTWEIN, *Ergebnisse der Physiologie* (1961), p. 131.

² H. HODITZ und H. LÜLLMANN, *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 280, 22 (1964).

³ A. GROSSMAN und R. F. FURCHGOTT, *J. Pharmacol. exp. Therap.* 145, 162 (1964).

Badflüssigkeit diente Tyrodelösung von 32°C, in der die Ca-Konzentration verändert wurde (0,6; 1,8 und 0,9 mM/l).

Aus Figur 1 ist ersichtlich, dass die ACh-Wirkung auf die Kontraktionsamplituden der Meerschweinchenvorhöfe bei einmaliger Gabe der Substanz in 1 min ein Maximum erreichte und bis zur zehnten min wieder abnahm. Bei ACh-Konzentrationen von 10^{-8} und 10^{-7} g/ml bestand zu allen Zeitpunkten ein signifikanter Unterschied in der

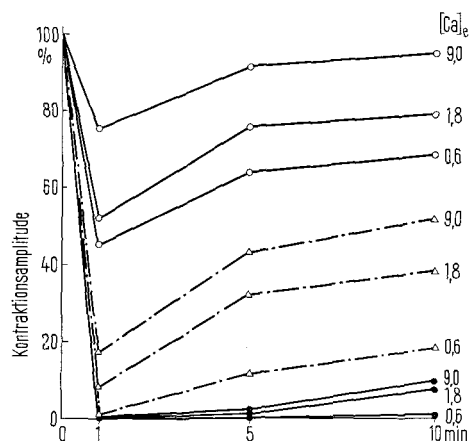


Fig. 1. Veränderungen der isotonisch registrierten Kontraktionsamplituden von isolierten Meerschweinchenvorhöfen unter ACh-Einwirkung (10^{-8} g/ml o—o, 10^{-7} g/ml Δ — Δ , 10^{-6} g/ml \bullet — \bullet) bei verschiedenen extrazellulären Ca-Konzentrationen ($[Ca]_e$ in mM/l). Ordinate: Kontraktionsamplituden der Vorhofpräparate in % der Ausgangslagen. Abszisse: Dauer der ACh-Einwirkung in min. Jeder Punkt der Kurven stellt einen Mittelwert von 6–9 Einzelwerten dar. Weitere Einzelheiten siehe Text.

hoher $[Ca]_e$. Bei Einwirkung der hohen ACh-Konzentration wurde die Aktionspotentialdauer im Bereich der 50%igen Repolarisation unter allen Bedingungen auf etwa 20 msec verkürzt. Die beiden geringeren ACh-Konzentrationen (10^{-7} und 10^{-8} g/ml) bewirkten zwar, bezogen auf die Ausgangslage, die relativ grössten Veränderungen der Repolarisationsgeschwindigkeit bei niedriger $[Ca]_e$, die absolut erreichten Werte der Aktionspotentialdauer im Bereich der 50%igen Repolarisation waren jedoch am längsten bei der niedrigen $[Ca]_e$ ($49,7 \pm 2,4$ und $99,5 \pm 3,1$ msec) und am kürzesten bei hoher $[Ca]_e$ ($25,0 \pm 0,9$ und $51,7 \pm 1,4$ msec). Die Unterschiede waren bei allen $[Ca]_e$ signifikant. Die gleichzeitig vorgenommenen isometrischen Messungen der Kontraktionskraft der Vorhöfe ergaben das gleiche Bild wie die oben besprochenen isotonischen Registrierungen (Figur 2).

In Übereinstimmung mit der Ansicht anderer Autoren wird die Auffassung vertreten, dass die Verminderung der Kontraktionskraft der Vorhöfe unter der Einwirkung von ACh eine Folge der Aktionspotentialverkürzung ist. Anscheinend reicht die Dauer der Erregung nicht mehr aus, um eine Aktivierung der Kontraktion zu bewirken. Da Ca-Ionen, die während der Erregung von der Zelloberfläche in das Zellinnere einströmen, im Herzen als Kopplungsglieder zwischen Erregung und Kontraktion angesehen werden⁴, wird bei extremer Verkürzung der Aktionspotentialdauer unter dem Einfluss vom ACh der Ca-Einstrom offenbar zu klein, um eine Kontraktion hervorzurufen. Erhöhung der $[Ca]_e$ vergrößert den Ca-Einstrom^{5,6}, entsprechend kann trotz kurzer Aktionspotentialdauer bei ACh-Einwirkung noch eine Kontraktion ausgelöst werden. Die Stärke der negativ inotropen Wirkung einer gegebenen ACh-Konzentration scheint demnach abhängig zu sein von der Höhe der $[Ca]_e$ und der dadurch bedingten Grösse des Ca-Einstroms in die Herzmuskelfaser während der Erregung.

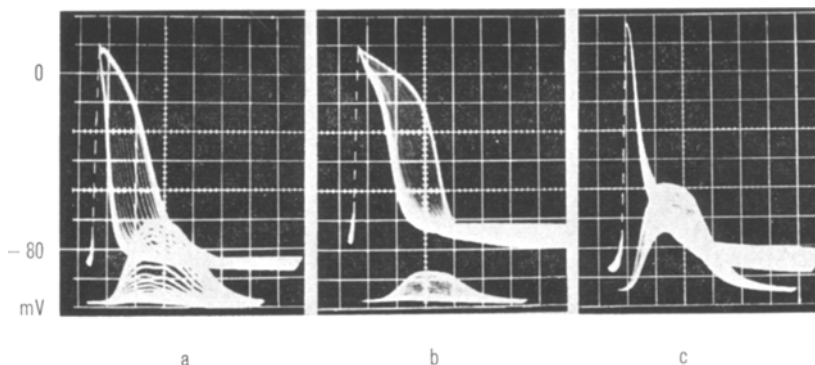


Fig. 2. Veränderungen von Aktionspotentialdauer und Kontraktionsamplituden eines isolierten Meerschweinchenvorhofs unter ACh-Einwirkung (10^{-7} g/ml) bei verschiedenen $[Ca]_e$ (a = 1,8, b = 0,6, c = 9,0 mM/l). Weitere Einzelheiten siehe Text.

Stärke der ACh-Wirkung in Abhängigkeit von der $[Ca]_e$. Die Streuungen sind in der Abbildung der Übersichtlichkeit wegen fortgelassen worden. Bei hoher $[Ca]_e$ war die negativ inotrope Wirkung von ACh deutlich geringer ausgeprägt als bei niedriger $[Ca]_e$. Bei der hohen ACh-Konzentration von 10^{-6} g/ml wurde die Kontraktionskraft der Vorhöfe unter allen Bedingungen vollständig gehemmt, nur nach 10 min Einwirkungsdauer wurden geringe Unterschiede sichtbar.

Die Ruhepotentiale der Vorhoffasern waren bei $[Ca]_e$ vom 1,8 und 0,6 mM/l im Mittel nicht unterschiedlich ($82,2 \pm 0,7$ bzw. $81,6 \pm 0,5$ mV), bei hoher $[Ca]_e$ kam es zu einer geringen Hyperpolarisation ($85,1 \pm 0,8$ mV). Die Aktionspotentialdauer war abhängig von der $[Ca]_e$, sie war am längsten bei geringer und am kürzesten bei

Summary. In the left auricles of guinea-pigs, Ca-ions have an antagonistic effect on the negative inotropic action of ACh. This effect is independent of the degree of shortening of the action potential by ACh.

H. REUTER

Pharmakologisches Institut der Universität Mainz (Deutschland), 14. Juli 1965.

⁴ H. C. LÜTTGAU und R. NIEDERGERKE, J. Physiol., Lond. 143, 486 (1958).

⁵ S. WINEGRAD und A. M. SHANES, J. gen. Physiol. 45, 371 (1962).

⁶ A. GROSSMAN und R. F. FURCHGOTT, J. Pharmacol. exp. Therap. 143, 107 (1964).