

Another interesting observation was the finding that in 7 out of 21 experiments following the pressor effect produced by 0.5 mg/kg of angiotensin a persistent hypotension developed ranging between 15–46 mm Hg. Similarly in 10 out of 20 experiments following the pressor effect produced by 2.5 mg/kg a hypotension developed ranging between 16–42 mm Hg. In 5 of these animals death ensued shortly after the onset of hypotension.

**Discussion.** The results of this investigation clearly show that the prevention, by  $\beta$ -TM 10, of catecholamine release from adrenergic nerve terminals did not in any way influence the blood pressure response to angiotensin. The hypertensive effect of angiotensin is probably due to a direct action on the cardiovascular system<sup>7</sup> and is not

mediated by neurotransmitters. A similar conclusion was reached by SAKURAI and HASHIMOTO<sup>8</sup>, using reserpine to deplete the tissues of catecholamines.

The secondary hypotensive effects following the use of angiotensin deserves further study since it occurred in many of the animals. It is probably not due to a sympathetic blockade by angiotensin, since, if anything, angiotensin has been shown to enhance blood pressure responses to norepinephrine<sup>8,9</sup>.

**Résumé.** On n'a pas pu observer un effet du  $\beta$ -TM 10 sur l'action de l'angiotensine chez le lapin. Cela indique probablement que l'angiotensine a directement son effet sur les cellules du récepteur. Après l'élévation de pression produite par les doses plus grandes de l'angiotensine, on a pu remarquer une réduction significative de la pression.

S. GELFAND<sup>10</sup> and A. GANZ

*Department of Medicine, The Long Island Jewish Hospital, New Hyde Park (N.Y., USA),  
March 1, 1966.*

Table II. Dose-response relationship of the angiotensin effect on blood pressure after  $\beta$ -TM 10

Number of experiments	Average number of injections	Dose of angiotensin (mg/kg)	Average increase in blood pressure (mm Hg)	CL <sup>a</sup>
5	2	0.1	22.6	3.8
5	2	0.5	43.4	4.4
5	2	2.5	73.0	12.0

<sup>a</sup> CL = 95% confidence limit.

<sup>7</sup> W. S. PEART, Pharmac. Rev. 17, 1965 (1965).

<sup>8</sup> T. SAKURAI and Y. HASHIMOTO, J. Pharmac. 15, 223 (1965).

<sup>9</sup> J. W. McCUBBIN and I. H. PAGE, Circul. Res. 12, 553 (1963).

<sup>10</sup> Work done during the tenure of a fellowship from the Sterling-Winthrop Research Institute, Renssalaer, N.Y.

<sup>11</sup> Acknowledgments: The authors wish to express their gratitude to Drs. E. MELMAN and J. ROBERTS for invaluable help.

## Über die Wirkung von Diäthyläther auf die Aktivität der Glykogenphosphorylase und Phosphorylase *b*-Kinase in Herz, Skelettmuskel und Leber der Ratte

Die Diäthyläther(Äther)-Narkose führt beim Menschen und bei einer Reihe von Versuchstieren zu einer Beeinflussung des Kohlehydratstoffwechsels, die wahrscheinlich mit einer durch das Narkotikum ausgelösten, erhöhten Aktivität des sympathischen Nervensystems in unmittelbarem Zusammenhang steht<sup>1</sup>. In der vorliegenden Untersuchung wurde anhand des Phosphorylase-Systems, das sehr empfindlich auf Veränderungen der Aktivität des Sympathikus zu reagieren vermag<sup>2</sup>, der Einfluss von Ätherinhalation näher analysiert.

**Material und Methoden.** Erwachsenen Ratten wurde unter Narkose der Musculus gastrocnemius, ein Stück der Leber und, unter künstlicher Beatmung, das Gesamtherz mittels der Kühlzangentechnik<sup>3</sup> nacheinander *in situ* eingefroren. Einige Tiere erhielten 20 min vor der Tötung eine intravenöse Injektion von Pronethalol (1(2-naphthyl)-2-isopropylaminoäthanhydrochlorid; freundlicherweise von J. W. BLACK, Imperial Chemical Industries Ltd., überlassen), einem Blocker der adrenergen  $\beta$ -Rezeptoren, der die phosphorylaseaktivierende Wirkung von injiziertem Adrenalin und von sympathischer Nervenreizung unterdrückt<sup>4</sup>.

100–150 mg Portionen der eingefrorenen Muskelgewebe wurden in einem mit flüssiger Luft vorgekühlten Mörser pulverisiert. Das Gewebspulver wurde zur Extraktion

mit dem 5fachen Volumen einer 60%igen Glyzerinlösung, die 0,02 M NaF, 0,005 M Diäthylaminotetraacetat, 0,03 M Cystein und 0,04 M Glyzerin-2-Phosphat (pH 6,8) enthielt, bei  $-35^{\circ}\text{C}$  vermischt und anschliessend mit dem 15fachen Volumen der gleichen, wässrigen Salzlösung versetzt<sup>5,6</sup>. Nach der Zentrifugation (10 min bei 7000 g) wurden in der überstehenden Flüssigkeit die Fermentaktivitäten bestimmt. Die Glykogenphosphorylase (EC 2.4.1.1) wurde nach ILLINGWORTH und CORI<sup>7</sup> und die Phosphorylase-*b*-Kinase (EC 2.7.1.38) nach KREBS et al.<sup>8</sup> bestimmt. Der Aktivierungsgrad des letztgenannten Fermentes wurde aus dem Verhältnis der gemessenen Fermentaktivitäten bei pH 6,8 und 8,2 errechnet<sup>6</sup>. Die Ex-

<sup>1</sup> N. M. GREENE, *Inhalation Anaesthetics and Carbohydrate Metabolism* (The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1963), p. 27.

<sup>2</sup> S. E. MAYER und N. C. MORAN, J. Pharmac. exp. Ther. 129, 271 (1960).

<sup>3</sup> A. WOLLENBERGER, O. RISTAU und G. SCHOFFA, Pflügers Arch. ges. Physiol. 270, 399 (1960).

<sup>4</sup> E.-G. KRAUSE und A. WOLLENBERGER, Biochem. Z. 342, 171 (1965).

<sup>5</sup> W. H. DANFORTH, E. HELMREICH und C. F. CORI, Proc. natn. Acad. Sci. Washington 48, 1191 (1962).

<sup>6</sup> J. B. POSNER, R. STERN und E. G. KREBS, Biochem. biophys. Res. Commun. 9, 293 (1962).

<sup>7</sup> R. B. ILLINGWORTH und G. T. CORI, Biochem. Prep. 3, 1 (1953).

<sup>8</sup> E.-G. KREBS, D. J. GRAVES und E. H. FISCHER, J. biol. Chem. 234, 2867 (1959).

traktion und Bestimmung der Phosphorylase aus Leber erfolgte nach den Angaben von SUTHERLAND und WOSILAIT<sup>9</sup>.

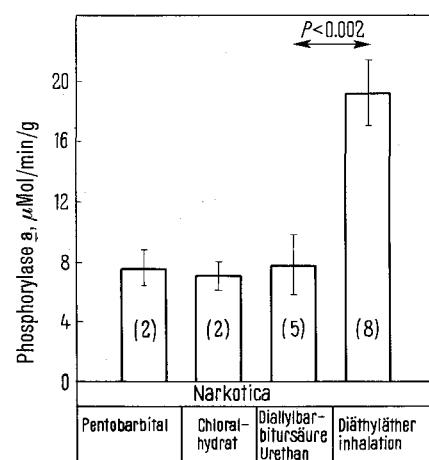
**Resultate und Diskussion.** Bei einem Vergleich der Phosphorylase-*a*-Aktivität im M. gastrocnemius bei Verwendung verschiedener Narkotika zeigte sich, dass Äther zu einer signifikanten Erhöhung des *a*-Anteils dieses Fermentes führt (Figur). Während bei Verwendung eines Diallylbarbitursäure-Urethan-Gemisches, wie auch nach Pentobarbital und Chloralhydrat stets weniger als 25% in der *a*-Form vorgefunden wurde, lag nach Inhalation von Äther mehr als 50% der Gesamtphosphorylaseaktivität als Phosphorylase *a* vor. Dieser Effekt wurde im Myokard nicht beobachtet, wo unabhängig von der Art der benutzten Narkotika die Phosphorylase-*a*-Aktivität zwischen 9 und 13% von der Gesamtaktivität gefunden wurde. Die Erhöhung des Gehalts des M. gastrocnemius an Phosphorylase *a* nach Inhalation von Äther konnte, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, durch vorhergehende Injektion von Pronethalol vollständig unterdrückt werden. Die Gesamtphosphorylaseaktivität im Skelet- und Herzmuskel zeigte unter den genannten Bedingungen keine Veränderungen.

Wie aus der Tabelle weiterhin hervorgeht, zeigt der Aktivierungsgrad der Phosphorylase-*b*-Kinase (Q: 6,8/8,2) ein paralleles Verhalten zu den Veränderungen des Phosphorylase *a*-Gehalts. Im Skeletmuskel kam es unter Äthernarkose zu einer Erhöhung dieses Quotienten von 0,16 auf 0,38, die durch Pronethalol komplett hemmbar war. Mit 0,53 wurde in den Herzmuskelextrakten ein höherer Quotient als im Skeletmuskel vorgefunden. Ein Effekt des Äthers wurde hier, parallel zum Verhalten der Phosphorylase-*a*, nicht beobachtet. Nach Pronethalol wurde mit 0,39 der niedrigste Aktivierungsgrad der Phosphorylase-*b*-Kinase ermittelt.

In Übereinstimmung mit BRUNNER, HOSTETTER und HAUGAARD<sup>10</sup> fanden wir bei den Tieren mit Äthernarkose eine Vermehrung der aktiven Leberphosphorylase, die durch Pronethalol nicht aufgehoben wurde (siehe Tabelle).

Der Status der Phosphorylase-*b*-Kinase und die Verteilung zwischen der *a*- und *b*-Form der Phosphorylase in

Muskelgeweben werden durch Adrenalin und Noradrenalin beeinflusst<sup>6</sup>. Pronethalol, als Blocker der adrenergen  $\beta$ -Rezeptoren, hemmt sowohl im Skeletmuskel<sup>11</sup> wie im Myokard<sup>4</sup> die phosphorylaseaktivierende



Phosphorylase-*a*-Gehalt im Musculus gastrocnemius der Ratte bei Anwendung verschiedener Narkotika. Zur Darstellung gelangen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. Die Zahl der Versuche ist in Klammern in den Säulen angegeben. Folgende Dosisierungen wurden benutzt: Pentobarbital (Nembutal, freundlicherweise von Prof. R. K. RICHARDS, Abbott Laboratories, North Chicago, Ill., überlassen): 35 mg/kg i.p.; Chloralhydrat: 300 mg/kg s.c.; Diallylbarbitursäure-Urethan-Gemisch: 125 mg Diallylbarbitursäure und 500 mg Urethan/kg i.p.; Diäthyläther-Inhalation: bis zur Erreichung einer operablen Narkosetiefe (Zeit von Beginn der Inhalation bis zur Gewinnung der Skeletmuskelprobe betrug ca. 5 min).

<sup>9</sup> E. W. SUTHERLAND und W. D. WOSILAIT, J. biol. Chem. 218, 459 (1956).

<sup>10</sup> E. A. BRUNNER, C. HOSTETTER und N. HAUGAARD, Fedn. Proceed. Soc. exp. Biol. 24, 150 (1965).

<sup>11</sup> H. I. E. S. ALI, A. ANTONIO und N. HAUGAARD, J. Pharmac. exp. Ther. 145, 142 (1964).

Die Aktivität der Phosphorylase und Phosphorylase-*b*-Kinase in Skelet- und Herzmuskel, sowie die Aktivität der Leber-Phosphorylase narkotisierter Ratten und der Einfluss von Pronethalol nach Diäthylätherinhalation

Gewebe	Behandlung	Anzahl der Tiere	Phosphorylase		Phosphorylase- <i>b</i> -Kinase <sup>a</sup>		
			$\mu\text{Mol Orthophosphat}/\text{min/g}$	$\frac{\text{II} \cdot 100}{\text{I}}$	$E_{\text{pH } 8,2}/\text{g}$	$\frac{E_{\text{pH } 6,8}}{E_{\text{pH } 8,2}}$	
			$a + b$ (I)	$a$ (II)			
Musculus gastrocnemius	Diallylbarbitursäure-Urethan (A)	3	30,9 $\pm$ 2,1	7,3 $\pm$ 1,7	24	318 $\pm$ 42	0,16 $\pm$ 0,05
	Äther (B)	3	28,6 $\pm$ 3,0	16,8 $\pm$ 1,9	59	378 $\pm$ 42	0,38 $\pm$ 0,07
	Äther + Pronethalol (7 mg/kg) (C)	4	29,0 $\pm$ 3,1	5,1 $\pm$ 1,3	18	352 $\pm$ 100	0,09 $\pm$ 0,04
Myokard	A	3	17,3 $\pm$ 1,0	2,30 $\pm$ 0,61	13	36,3 $\pm$ 2,7	0,53 $\pm$ 0,06
	B	3	18,4 $\pm$ 1,1	2,19 $\pm$ 0,48	12	43,0 $\pm$ 7,7	0,48 $\pm$ 0,03
	C	3	17,1 $\pm$ 1,4	1,57 $\pm$ 0,31	9	52,2 $\pm$ 13	0,34 $\pm$ 0,11
Leber	A	3	—	8,38 $\pm$ 1,7	—	—	—
	B	3	—	11,6 $\pm$ 0,9	—	—	—
	C	4	—	12,0 $\pm$ 1,0	—	—	—

Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen werden angegeben. <sup>a</sup>Als 1 Einheit der Phosphorylase-*b*-Kinase-Aktivität (bestimmt bei pH 6,8 oder 8,2) wurde diejenige Fermentmenge definiert, die in einer Minute unter den Testbedingungen nach KREBS et al.<sup>8</sup> zur Bildung einer Phosphorylase-*a*-Aktivität führt, die bei pH 6,1 und 30°C in Abwesenheit von Adenosinmonophosphat 1  $\mu\text{Mol Orthophosphat}/\text{min}$  freisetzt.

Wirkung dieser Verbindungen. Aus diesem Grunde sollte die unter Äthernarkose eintretende, durch Pronethalol hemmbare Aktivierung der Phosphorylase-*b*-Kinase und der Phosphorylase im Skeletmuskel auf adrenergen Mechanismen beruhen. Das unterschiedliche Verhalten der beiden Enzyme in Skelet- und Herzmuskel nach Ätherinhalation spricht dafür, dass die Ätherwirkung weniger über die Nebennieren als über das sympathische Nervensystem zustandekommt, wobei möglicherweise der unter Äthernarkose im Vergleich zu den Barbituratoren länger erhaltene Muskeltonus von Bedeutung ist. Inwiefern Pronethalol im Muskelgewebe oder im Zentralnervensystem<sup>12</sup> wirksam wird, kann nicht entschieden werden. Auf Grund der injizierten Pronethalolmenge (7 mg/kg) sollte aber eine zentrale Wirkung dieser Substanz gering sein<sup>12</sup>.

Die Aktivierung der Leberphosphorylase unter Äthernarkose war durch Pronethalol nicht hemmbar. Da Untersuchungen an der Ratte ergeben haben, dass die durch Adrenalin auslösbarer Aktivierung der Phosphorylase an Leberschnitten<sup>11</sup> total gehemmt, *in vivo*<sup>13</sup> aber nur teilweise aufgehoben wird, ist eine genaue Differenzierung der Ätherwirkung auf die Phosphorylase in der Leber bisher nicht möglich, doch ist auch hier eine Wir-

kung über sympathische Innervierung wahrscheinlich (siehe<sup>1</sup>).

**Summary.** The rise of phosphorylase *a* activity and the activation of phosphorylase *b* kinase in skeletal muscle of the rat in diethyl ether anaesthesia are inhibited by a blocker of the adrenergic  $\beta$  receptors, pronethalol. This agent has no effect on the increased activity of liver phosphorylase under the same conditions. There are no effects of this anaesthetic on the phosphorylase *a* level in myocardium.

E.-G. KRAUSE

*Institut für Kreislaufforschung, Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch (DDR),*  
21. Februar 1966.

<sup>12</sup> A. MORALES-AGUILERA und E. M. VAUGHAN WILLIAMS, Br. J. Pharmac. 24, 319 (1965).

<sup>13</sup> K. R. HORNBROOK und T. M. BRODY, Biochem. Pharmac. 12, 1407 (1963).

## PRO EXPERIMENTIS

### A Modification of Müller's Experimental Device for Obtaining a Growth of the Primary Roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. under controlled Conditions

The growth of the primary roots of *Arabidopsis* on moistened filter paper in 60° sloped Petri dishes is influenced by such factors as light intensity and degree of moisture content (MÜLLER<sup>1</sup>). Light intensity, in sloped

Petri dishes, decreases from the top, while moisture content increases.

In order to avoid as much as possible any variation in root length, due to different conditions of light intensity and moisture content (position of the seeds on the filter paper), we use the experimental device represented in the Figure.

The seeds are arranged on moistened filter paper in unnecked funnels in the manner indicated in the Figure. The funnels are put on a moistened layer of paper-wool, thick enough to ensure a constant moisture content of the filter paper by capillary attraction during the whole period (5–6 days) of the experiments.

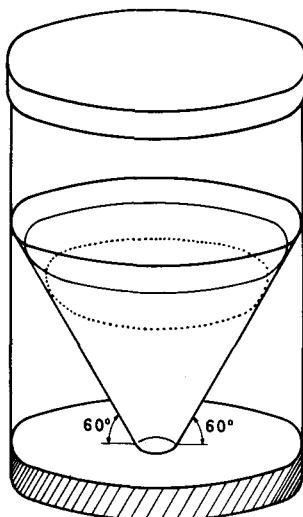
Furthermore, all the seedlings grow under the same light intensity, being arranged along a circumference. The number of seeds per funnel depends obviously on its diameter. We usually arranged about 250 seeds in funnels having a diameter of no more than 7 cm.

**Riassunto.** L'allineamento dei semi di *Arabidopsis* lungo una circonferenza su carta filtro disposta all'interno di imbuti senza collo (60°) e costantemente imbibita per capillarità, permette di ottenere la crescita delle radici primarie in condizioni costanti di umidità e di intensità di luce.

S. BONOTTO

*Section of Cellular Biochemistry, Department of Radiobiology, C.E.N., Mol (Belgium),*  
February 23, 1966.

Diagrammatic representation of the experimental device used to control the root growth at 60°. The funnel (unnecked) put on moistened paper-wool.



<sup>1</sup> A. J. MÜLLER, Kulturpflanze 12, 237 (1964).