

Serotonin levels in  $\mu\text{g/g}$  mucosa  $\pm$  1 standard error, and as a % of control values in rat jejunal mucosa before and after reserpine (5.0 mg/kg i.p.) in 2 strains of rats

Time in h post- injection	Rat source		Shed IV <sup>a</sup>	%	<i>p</i> value
	Shed I <sup>a</sup>	%			
0	7.51 $\pm$ 0.28 (17) <sup>b</sup>	100	6.80 $\pm$ 0.19 (26)	100	< 0.025
0.5	8.37 $\pm$ 0.23 (15)	111 <sup>c</sup>	6.44 $\pm$ 0.35 (5)	95	< 0.001
2	4.74 $\pm$ 0.24 (13)	63	5.79 $\pm$ 0.17 (14)	85	< 0.005
3	3.88 $\pm$ 0.09 (23)	52	5.95 $\pm$ 0.25 (10)	88	< 0.001
4	3.48 $\pm$ 0.11 (17)	46	5.53 $\pm$ 0.17 (26)	81	< 0.001
16	5.01 $\pm$ 0.16 (8)	67	6.81 $\pm$ 0.27 (12)	100	< 0.001

<sup>a</sup> Indicates the breeding shed of origin at Charles River laboratories. Each shed being of separate Sprague-Dawley origin and autonomous. <sup>b</sup> Indicates the number of rats. <sup>c</sup> Results expressed as a % of the values at 0 time.

explained by such factors as indicated in this short communication.

It is unlikely that a more rapid metabolism of reserpine in the animals from shed IV was responsible for the differences noted, as the development of and persistence of systemic signs of reserpine treatment were similar in the 2 groups<sup>10</sup>.

**Zusammenfassung.** Es wurde ein statistisch gesicherter unterschiedlicher Serotonin gehalt im Darmtraktus zweier unabhängig gezüchteter Rattengruppen von Sprague-Dawley Abstammung und ihre unterschiedliche Ansprechbarkeit auf die Serotonin entleerende Wirkung des Reserpins gefunden.

J. H. THOMPSON

Department of Pharmacology, School of Medicine, The Center for the Health Sciences, University of California, Los Angeles (California 90024, USA),  
August 4, 1966.

<sup>10</sup> The author wishes to express his thanks to Prof. T. J. HALEY, Department of Nuclear Medicine and Radiation Biology, Los Angeles (California) for use of the Aminco-Bowman Spectrophotofluorometer. L. BRUCE CAMPBELL rendered valuable technical assistance. This research was supported by USPHS grant No. AM 07909.

## Zur Spezifität des durch Bradykinin, Kallidin und Met-Kallidin ausgelösten Blutdruckreflexes an der Katze

Bei intraarterieller Gabe von Bradykinin in die isolierte Hinterpfote der Katze kommt es zu einer Vasokonstriktion im peripheren Gefäßgebiet<sup>1</sup>. Die quantitativen Verhältnisse für Bradykinin und Kallidin wurden von uns bereits dargestellt<sup>2</sup>. Über die pharmakologische Beeinflussung der Gefäßverengung durch Sympathikolytika vom  $\alpha$ - und  $\beta$ -Typ, Kokain, Guanethidin und Reserpin haben wir kürzlich berichtet<sup>3</sup>. Danach ist zu vermuten, dass Bradykinin ohne Vermittlung von Katecholaminen direkt am Gefäß angreift. Darüber hinaus lösen Kinine im Körper des Tieres einen Blutdruckreflex und eine Atemstimulation von kurzer Dauer aus (LIM et al.<sup>4-6</sup>, HASHIMOTO et al.<sup>7</sup>, WIEGERSHAUSEN und REINCKE<sup>2</sup>).

Mit dieser Mitteilung beabsichtigen wir eine Erweiterung unserer Befunde insofern, dass wir mit der von uns bereits geschilderten Methode<sup>2</sup> an Katzen auch Reaktionen der Nickhaut erfassen und ein weiteres Kinin, das Met-Kallidin<sup>8</sup>, in unsere Untersuchungen einbezogen. In dieser Versuchsreihe stand vor allem die pharmakologische Beeinflussung des reflektorischen Geschehens am Ganztier im Vordergrund, da auch andere Substanzen, wie zum Beispiel das Acetylcholin, ähnliche Reaktionen auslösen können.

Met-Kallidin (10–20  $\mu\text{g}/\text{Tier}$ ) intraarteriell in die isolierte Extremität gegeben, führt qualitativ zu den gleichen Reaktionen, wie wir sie bereits mit den anderen Kininen beobachten konnten. Darüber hinaus wird im Zusammenhang mit der durch die Kinine ausgelösten

Stimulation des sympathischen Systems die Nickhaut regelmäßig kontrahiert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die afferente Erregung über sensible Strukturen des N. ischiadicus geleitet wird<sup>4</sup>. Die Abschwächung bzw. das Verschwinden der Reflexe im Verlauf des Versuchs lässt sich weniger durch eine Tachyphylaxie erklären, als vielmehr durch eine zunehmende Abnahme des Leitungsvermögens des Nerven infolge der sich ausbreitenden nervalen Anoxie bei längerer Versuchsdauer.

Bei molarem Vergleich einiger bekannter Substanzen, die einen Blutdruckreflex auslösen können, erweisen sich Kinine als hoch spezifisch (Tabelle). Histamin, das ebenfalls peripher vasokonstriktorisch wirkt, ist in einer Dosierung bis zu 400  $\mu\text{g}$  nicht in der Lage, an der Katze einen Blutdruckreflex zu induzieren, im Gegensatz zu den

<sup>1</sup> P. S. GUTH, G. CANO und J. JARAMILLO, Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 69 (1963).

<sup>2</sup> B. WIEGERSHAUSEN und A. REINCKE, Experientia 22, 90 (1966).

<sup>3</sup> B. WIEGERSHAUSEN und G. HENNIGHAUSEN, Experientia 22, 234 (1966).

<sup>4</sup> F. GUZMAN, C. BRAUN und R. K. S. LIM, Archs int. Pharmacodyn. Thér. 136, 352 (1962).

<sup>5</sup> G. D. POTTER, F. GUZMAN und R. K. S. LIM, Nature 193, 983 (1962).

<sup>6</sup> R. K. S. LIM, F. GUZMAN, D. W. RODGERS, K. GOTO, C. BRAUN, G. D. DICKERSON und R. J. ENGLE, Arch. int. Pharmacodyn. Thér. 152, 25 (1964).

<sup>7</sup> K. HASHIMOTO, S. KUMAKURA und N. TAIRA, Jap. J. Physiol. 14, 299 (1964).

<sup>8</sup> Für die Überlassung der Kinine danken wir Herrn Dr. E. SCHROEDER, Leiter der Biochemischen Abteilung der Schering AG, Berlin-West.

## Vergleich von Substanzen, die einen Blutdruckreflex auslösen

Substanz	Molekular- gewicht (Base)	Dosis ( $\mu\text{g}$ ) Katze	Hund	Dosis ( $M$ ) Katze	Hund	Dosisrelation Katze	Hund
Bradykinin-acetat	1060,2	3,3– 6,6	2,1 <sup>4,7</sup>	3,1– 6,2 · 10 <sup>-8</sup>	2,0 · 10 <sup>-8</sup>	1	1
Kallidin-acetat	1188,4	3,3– 6,6		2,8– 5,6 · 10 <sup>-8</sup>		0,9	
Met-Kallidin-acetat	1319,6	8,0–16,0		6,1–12,2 · 10 <sup>-8</sup>		2,0	
Acetylcholin-chlorid	163,2	36,0–72,0	530 <sup>4</sup>	2,2– 4,4 · 10 <sup>-7</sup>	3,2 · 10 <sup>-6</sup>	71	1600
Histamin-dihydrochlorid	111,2	—*	100 <sup>4</sup>	—	9,0 · 10 <sup>-7</sup>	—	450
Phenylbutazon-natrium	308,4	3722–7444		1,2– 2,4 · 10 <sup>-5</sup>		3871	

\* In unseren Versuchen haben wir bis zu 400  $\mu\text{g}$  eingesetzt.

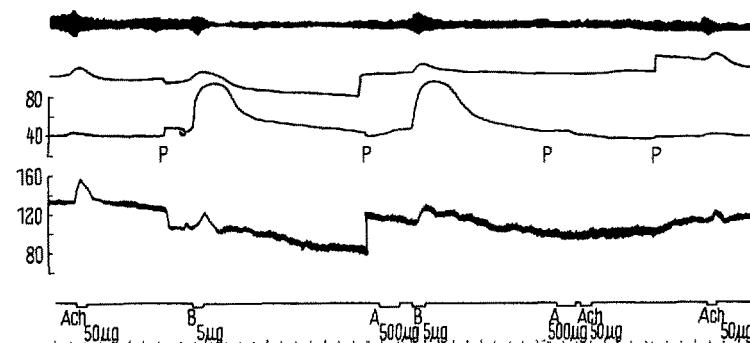


Fig. 1. Katze 2,5 kg, Urethannarkose. Von oben nach unten: Atmung, Nickhaut, Einflussdruck (isolierte Hinterpfote), Blutdruck (A. carotis) Signalschreibung, Zeitschreibung (30 sec). Bei Ach = 50  $\mu\text{g}$  Acetylcholin, B = 5  $\mu\text{g}$  Bradykinin, A = 500  $\mu\text{g}$  Atropin, P = Versuchsunterbrechung.

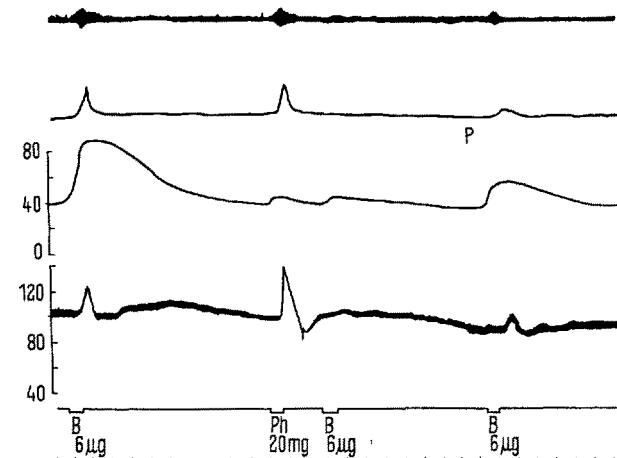


Fig. 2. Katze 3,0 kg, Urethannarkose. Von oben nach unten: Atmung, Nickhaut, Einflussdruck (isolierte Hinterpfote), Blutdruck (A. carotis) Signalschreibung, Zeitschreibung (30 sec). Bei B = 6  $\mu\text{g}$  Bradykinin, Ph = 20 mg Phenylbutazon, P = Versuchsunterbrechung.

Befunden von GUZMAN et al.<sup>4</sup>. Auch die von HASHIMOTO et al.<sup>7</sup> untersuchten Verbindungen zeigen keine so hohe Spezifität wie die Kinine. Andere synthetische Peptide, unter anderen auch das Eledoisin (WIEGERSHAUSEN<sup>8</sup>), sind nicht reflexauslösend.

Durch Vorbehandlung der isolierten Extremität mit Atropin (200–300  $\mu\text{g}$ ) können die durch Acetylcholin ausgelösten reflektorischen Reaktionen vorübergehend unterdrückt werden, grössere Atropinmengen (500–750  $\mu\text{g}$ ) lassen jedoch die hemmende Wirkung nicht über 7 min anhalten. Dagegen sind die durch die Kinine ausgelösten Reflexe, sowie die Vasokonstriktion atropinresistent (Figur 1).

Wir müssen daher annehmen, dass sich die Angriffsorte des Acetylcholins und der Kinine im peripheren Gefäßsystem voneinander unterscheiden. Dafür sprechen schon die verschiedenen Wirkungen in der Peripherie. Die Kinine führen zu Vasokonstriktion, Acetylcholin nicht. Beide Substanzen induzieren aber durch eine unterschiedliche Anzahl von Molekülen im Organismus der Katze gleiche reflektorische Reaktionen (Tabelle).

Über die antagonistische Wirkung von Phenylbutazon auf die Bradykininreaktionen am Gefäßsystem *in vitro*<sup>11–14</sup> und *in vivo*<sup>6,10,11,13–16</sup>, wurde bereits berichtet. Bei Gabe von 20 mg Phenylbutazon<sup>16</sup> (Figur 2) in die isolierte Hinterpfote lassen sich die durch Kinine und Acetylcholin ausgelösten Reaktionen am systemischen Blutdruck, der Atmung und der Nickhaut unterdrücken; 40 mg Phenylbutazon verhindern vollständig die periphere Vasokonstriktion der Kinine und des Histamins. Bemerkenswert erscheint, dass Phenylbutazon auch selbst reflektorische Reaktionen im Ganztier auszulösen vermag. Der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration von Phenylbutazon (pH um 9,0) konnte ausgeschlossen werden. Die Spezifität des Phenylbutazons im Vergleich zu den Kininen ist nicht sehr hoch (Tabelle).

Die von uns beobachteten Reaktionen haben grosse Ähnlichkeit mit den von ASP<sup>17</sup> und HUNT<sup>18</sup> beschrie-

<sup>9</sup> B. WIEGERSHAUSEN, Wiss. Z. Univ. Rostock, Math.-Nat. Reihe 15, 730 (1966).

<sup>10</sup> J. LECOMTE, C. r. Soc. Biol. 154, 2389 (1960).

<sup>11</sup> J. LECOMTE und J. TROQUET, C. r. Soc. Biol. 154, 1115 (1960).

<sup>12</sup> K. GREEFF und E. MOOG, Arch. exp. Path. 248, 204 (1964).

<sup>13</sup> K. TÜRKER und B. K. KIRAN, Arzneimittel-Forsch. 14, 1318 (1964).

<sup>14</sup> H. KLUPP und H. KONZETT, Arch. exp. Path. 249, 479 (1965).

<sup>15</sup> B. VARGAFTIG, Experientia 22, 182 (1966).

<sup>16</sup> Dem VEB Chemisch-Pharmazeutisches Werk Oranienburg sei für das Phenylbutazon gedankt.

<sup>17</sup> D. ASP, Ber. sächs. Akad. Wiss. 19, 135 (1867).

<sup>18</sup> R. HUNT, J. Physiol. 18, 381 (1895).

benen Effekten, die nach elektrischer Reizung des zentralen Endes durchschnittener, afferenter somatischer Nerven bei verschiedenen Tierarten auftreten. Diese Wirkungen bezeichneten WOODWORTH und SHERRINGTON<sup>19</sup> als «pseudaffektive» Reaktionen, da sie auch an decerebrierten Katzen nach nociceptiven Reizungen auszulösen sind.

Unsere Versuche deuten darauf hin, dass es in peripheren Gefäßen verschiedene Arten von Chemorezeptoren gibt, die mit der Schmerzauslösung in enger Verbindung stehen. Sie sind pharmakologisch unterschiedlich beeinflussbar und wahrscheinlich auch speziesabhängig, so dass eine Verallgemeinerung, wie LIM et al.<sup>8</sup> vorschlagen, verfrüht erscheint. Zu ähnlichen Erkenntnissen kommen auch COLLIER et al.<sup>20</sup>. Bekanntlich ist die intravasale Gabe von Phenylbutazon am Menschen sehr schmerhaft, ein Hinweis, der die durch diese Substanz hervorgerufenen reflektorischen Reaktionen zu erklären vermag.

Zur Auslösung des Blutdruckreflexes und anderer reflektorischer Reaktionen haben sich die Kinine von allen bisher untersuchten synthetischen Substanzen als die wirksamsten erwiesen.

**Summary.** Synthetic kinins (bradykinin, kallidin and met-kallidin) administered via the femoral artery in the

isolated hindlimb of the cat elicits vasoconstriction, a reflex on the systemic blood pressure, a stimulation of respiration, and contraction of nictitating membrane. Acetylcholine elicits these reflex reactions in the body too. Atropine blocks this reflex, but not the reactions of kinins. Phenylbutazone administered via the femoral artery blocks the reflex reactions of acetylcholine and kinins as well as the vasoconstriction of histamine and the kinins in the isolated hindlimb. Phenylbutazone elicits by itself a reflex reaction. Of all the synthetic substances, the kinins are the most specific drugs inducing reflex reactions.

B. WIEGERSHAUSEN und B. KLAUSCH

Institut für Pharmakologie der Universität Rostock  
(DDR), 14. Juli 1966.

<sup>19</sup> R. S. WOODWORTH und C. S. SHERRINGTON, J. Physiol. 31, 234 (1904).

<sup>20</sup> H. O. COLLIER, A. R. HAMMOND, S. HORWOOD-BARRET und C. SCHNEIDER, Nature 204, 1316 (1964).

## Protoporphyrin und Hämin in Kulturfiltraten von *Achromobacter metalcaligenes*

Protohäm und seine unmittelbaren Präkursoren, Protoporphyrinogen und Protoporphyrin, sind in der Regel an partikuläre Systeme gebunden<sup>1</sup>; extrazelluläre Dicarboxylyporphyrinderivate treten jedoch bei einigen Porphyriformen des Menschen und unter experimentellen Bedingungen bei Chlorella-Mutanten<sup>2</sup> sowie bei Vertretern der fakultativ heterotrophen Athiorrhodaceae<sup>3</sup> auf. Das Leg-Hämoglobin der stickstoffixierenden Wurzelknöllchen ist wahrscheinlich ein extrazelluläres Produkt des bakteriellen Symbionten<sup>4</sup>. Zahlreiche cytochrombildende, aerobe Bakterien geben unter hypoxischen Kulturbedingungen einen makromolekularen, löslichen Faktor in das Medium ab, welcher das Wachstum protoporphyrinbedürftiger Haemophiluskulturen, wie zum Beispiel *Haemophilus influenzae*, ermöglicht (sogenannte X-Faktoraktivität)<sup>5-7</sup>. Die Untersuchung der Produktionsbedingungen dieses Haemophiluswuchsfaktors bei *Achromobacter metalcaligenes*<sup>8,8</sup> zeigte, dass es sich hierbei um ein physiologischerweise freigesetztes Produkt, nicht aber um ein Zellzerfallsprodukt handelt. δ-Aminolävulinsäure fördert die Produktion des Haemophilusfaktors durch *A. metalcaligenes* in definierten Medien<sup>8</sup>. Mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie war es möglich, in Kulturfiltraten von *A. metalcaligenes*, welche *Haemophilus*-X-Faktoraktivität zeigten, die den Ergebnissen des biologischen Tests<sup>6</sup> entsprechenden Mengen Protoporphyrin und Hämin zu erhalten. Diese Befunde erklären einerseits die biologische Aktivität der Kulturfiltrate und gestatten andererseits die Annahme, dass die Freisetzung von Protoporphyrin bei heterotrophen Bakterien weit verbreitet ist.

**Methode.** (1) Produktion und Anreicherung des biologisch aktiven Materials: Dichte Suspensionen von *A. metal-*

*caligenes* (Nr. ST 661-K3<sup>9</sup>) wurden in einem definierten Medium (Na-D,L-Lactat 0,025M, Na-Fumarat 0,025M, δ-Aminolävulinsäure<sup>9</sup> 0,002M, Ferricitrat 10<sup>-5</sup>M, NaCl 0,03M, NH<sub>4</sub>Cl 0,02M, MgSO<sub>4</sub> 8,1 · 10<sup>-4</sup>M, Na-K-Phosphat nach Sörensen, 0,067M, pH 7,2) mit mässiger Belüftung für 24 h bei 37 °C bebrütet, wie früher beschrieben<sup>8</sup>, und bei 10000 g (+ 5 °C, 15 min) sedimentiert. Der makromolekulare Anteil des zellfreien Überstandes wurde mittels eines LKB-Ultrafilters bei + 4 °C auf etwa 1% des Ausgangsvolumens eingeengt und auf Sephadex G50 oder G75 in Phosphatpuffer (0,067M, pH 7,2) angereichert<sup>8</sup>. Daneben wurde der Überstand statischer Kulturen von *A. metalcaligenes* in einem komplexen Medium (Proteose peptone Nr. 3 Difco 2%, NaCl 0,6%, Tris(hydroxymethyl)aminomethan q.s., pH 7,2, Glucose 0,5%, separat sterilisiert)<sup>5</sup> nach den gleichen Methoden aufgetrennt.

(2) Biologischer Test: *H. influenzae* (Nr. 218/63 HIH) wurde als Indikator für Protoporphyrin, *H. aegyptius* (Nr. 15 Leidy<sup>10</sup>) zum Nachweis von Protohäm benutzt unter Bedingungen, bei denen diese Substanzen das

<sup>1</sup> S. SANO und S. GRANICK, J. biol. Chem. 236, 1173 (1961).

<sup>2</sup> L. BOGORAD und S. GRANICK, J. biol. Chem. 202, 793 (1953); S. GRANICK, L. BOGORAD und H. JAFFE, J. biol. Chem. 202, 801 (1953).

<sup>3</sup> J. LASCELLES, J. gen. Microbiol. 15, 404 (1956).

<sup>4</sup> A. I. VIRTANEN, Nature, Lond. 155, 747 (1945); F. J. BERGERSEN, Bact. Rev. 24, 246 (1960).

<sup>5</sup> W. MANNHEIM, Zbl. Bakt. I Orig. 198, 516 (1965).

<sup>6</sup> W. MANNHEIM, Pathol. Microbiol. 29, 341 (1966).

<sup>7</sup> W. MANNHEIM, Zbl. Bakt. I Orig., im Druck.

<sup>8</sup> W. MANNHEIM und H. BÜRGER, Zbl. Bakt. I Orig., im Druck.

<sup>9</sup> Fluka AG, Buchs SG, Schweiz.

<sup>10</sup> Erhalten von Herrn Dr. D. C. WHITE, Lexington, Ky., USA.