

XD is a non-particulate cytoplasmic enzyme¹³ and could very well be capable of passing through an abnormal cell wall. This mechanism could explain the rise observed in serum XD during colchicine treatment of rats once a decrease was observed in the enzyme content of the liver. Nevertheless, this could not entirely explain the increase in serum enzyme activity following CCl_4 since the liver enzyme is also activated, both in vivo and in vitro, by CCl_4 ¹¹. This is possibly due to a direct effect of CCl_4 on the lipid moiety that may be associated with the enzyme molecule¹⁴.

Résumé. Une augmentation de l'activité de la xanthine déshydrogénase et de la xanthine oxydase du sérum des animaux ayant reçu du tetrachlorure de carbone ou de la colchicine a été observée. Il nous semble que cette augmentation soit en relation avec des variations du

métabolisme lipidique, puisque dans les conditions expérimentales mentionnées, des changements du taux des acides gras non saturés ont également été constatés. Les auteurs discutent certaines hypothèses sur les variations simultanées de l'activité des enzymes du foie et du sérum dans des animaux injectés.

OTTILIA R. AFFONSO, E. MITIDIERI
and L. P. RIBEIRO

Biochemical Laboratory, Instituto Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro (Brazil), 14th September 1966.

¹³ G. G. VILLELA, E. MITIDIERI and O. R. AFFONSO, *Nature* 175, 1087 (1955).

¹⁴ This research was supported by grants from the Conselho Nacional de Pesquisas (Brazil).

Dati preliminari sulla presenza di zinco nel veleno cutaneo di anfibi

Recenti dati sperimentali di COLBURN e MAAS¹ hanno dimostrato come il rapporto tra adrenalina e noradrenalina e ATP possa stabilirsi mediante un metallo chelante con formazione di complessi ternari.

Impegnati in una ricerca sulla presenza di ATP nel veleno cutaneo degli anfibi² ci siamo prospettati la possibilità che anche tra l'ATP e le varie sostanze 5-idrossindoliche presenti nel veleno stesso potessero almeno in parte attuarsi condizioni simili. Pertanto abbiamo voluto cominciare a raccogliere qualche dato sulla presenza eventuale di metalli cui potesse essere attribuita una funzione del genere; la nostra attenzione si è in primo luogo rivolta alla dimostrazione dello zinco anche perchè per questo metallo esistono delle buone possibilità di rivelazione istochimica³.

Intendiamo qui render conto di qualche risultato preliminare raccolto in attesa di poter dare più ampio sviluppo alle nostre osservazioni.

Già alcune prove preliminari condotte su materiale fresco di veleno di *Salamandra maculosa*, *Bombinator pachypus* e *Triton cristatus* sottoposto alla reazione al ditizone secondo il procedimento di FISCHER⁴ avevano dimostrato positività intensa per lo zinco.

Successivamente, seguendo il procedimento di MALMSTRÖM⁵ abbiamo seguito spettrofotometricamente la reazione al ditizone sia su standard di ZnCl_2 e CuCl_2 e così pure su ceneri ottenute da veleno di *S. maculosa* e *B. pachypus*.

I risultati sono riportati nel grafico di Figura 1. Si osserva un picco attorno a 530 nm per la reazione Ditizone-Zn; cui corrispondono analoghi picchi per i veleni di *Salamandra* e *Bombinator*. Per *Bombinator* è evidente altresì un picco attorno a 420 nm che poteva far pensare alla presenza di Cu, come si vede bene nel grafico per la reazione Ditizone-Cu; circa la presenza di questo metallo intendiamo occuparci in seguito in altra sede.

Per confermare i dati relativi alla presenza di Zn ottenuti spettrofotometricamente e volendo estendere anche ad altre specie le osservazioni, abbiamo sottoposto campioni incineriti a + 600 °C all'esame polarografico. Le curve polarografiche sono state registrate in soluzione

tiocianica tamponata a pH 6,8 complessando il ferro eventualmente presente con NaF ⁶.

Per ora abbiamo avuto dati nettamente positivi con metodo polarografico nelle seguenti specie: *T. cristatus*, *S. maculosa* e *B. pachypus* come dimostrano i grafici in Figura 2.

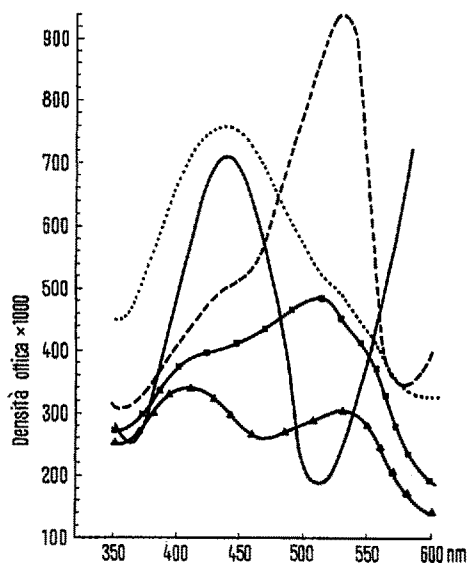


Fig. 1. Determinazione spettrofotometrica dello Zn mediante reazione al ditizone. —, Ditizone; ·····, Ditizone + CuCl_2 ; - - - - -, Ditizone + ZnCl_2 ; ■—■—■, Ditizone + veleno *Salamandra maculosa*; ▲—▲—▲, Ditizone + veleno *Bombinator pachypus*.

¹ R. W. COLBURN and J. W. MAAS, *Nature* 208, 37 (1965).

² M. VIALI e L. BOLOGNANI, *Archs Sci. biol.*, 50, 80 (1966).

³ K. OKAMOTO, *Acta Sch. med. Univ. Kioto* 32, 99 (1942).

⁴ H. FISCHER, *Mikrochemie* 8, 319 (1930) reported by F. FEIGL in *Spot Test* (Elsevier Publ. Company, 1954), vol. I, p. 171.

⁵ G. MALMSTRÖM, in D. GLICK, *Meth. biochem. Analysis* 3, 327 (1956).

⁶ Ringraziamo vivamente il Prof. V. RIGANTI dell'Istituto di Chimica Generale della nostra Università che gentilmente ha eseguito le determinazioni polarografiche.

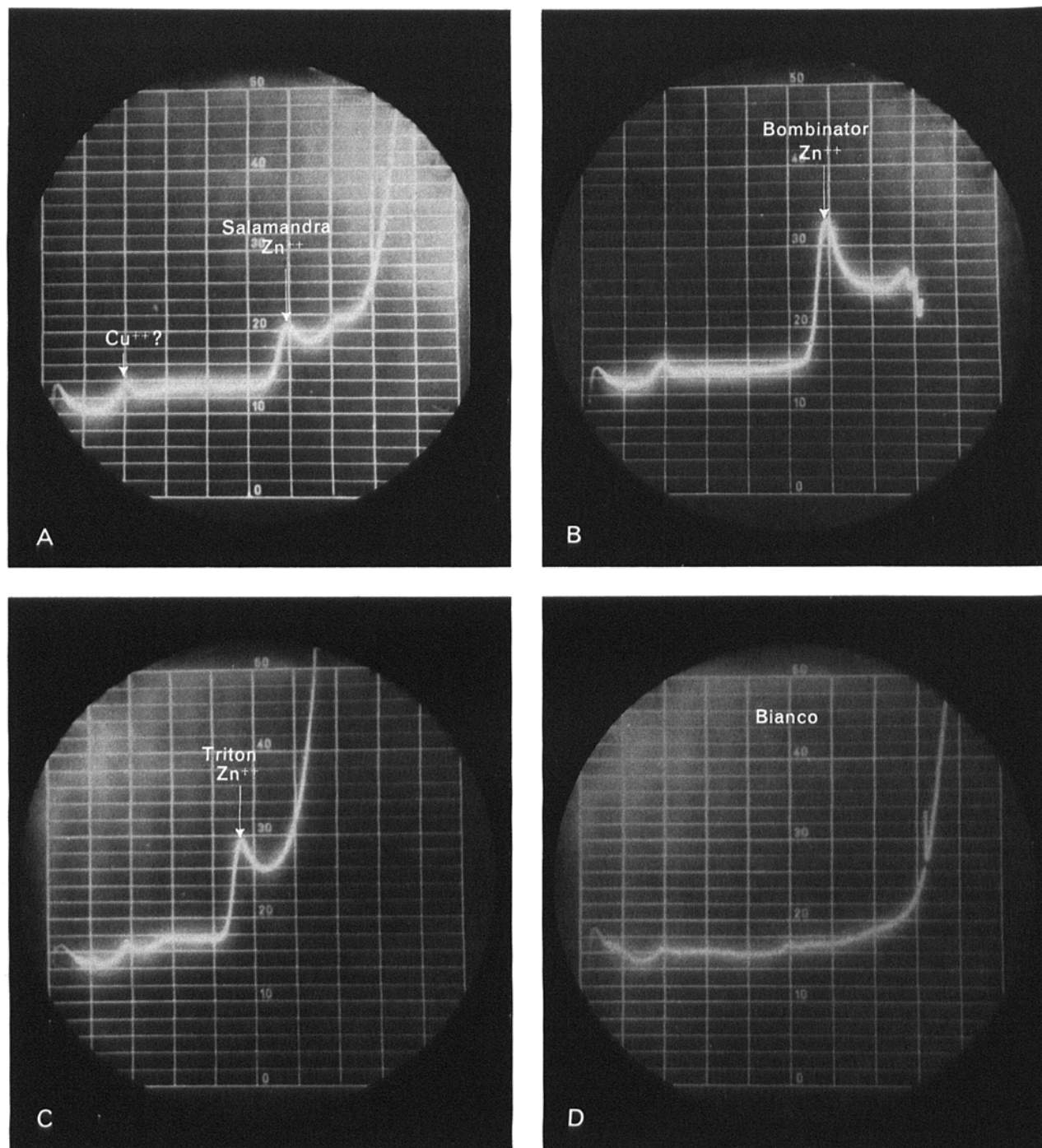


Fig. 2. Determinazione dello Zn mediante esame polarografico. A, Salamandra mg ceneri 48,4, incinerimento a + 750°C (non si ottengono ceneri bianche neppure per prolungato trattamento a 750°C); B, Bombinator mg ceneri 4,4 e C, Triton mg ceneri 4,3, incinerimento a + 600°C; D, Bianco.

Come si vede viene confermata la presenza di Zn per *Bombinator*, *Salamandra* e *Triton*. Appare inoltre, particolarmente in *Bombinator*, traccia di Cu e questo ci sembra confermare il dato ottenuto con la reazione al ditizone nella stessa specie.

Pur possedendo già alcuni dati quantitativi noi riteniamo più opportuno rimandarne la comunicazione in quanto come abbiamo ampiamente precisato in una parte critica di altro nostro lavoro² la composizione dei veleni è

soggetta a notevolissime variazioni stagionali, ambientali e in rapporto al luogo d'origine. È ovvio che i dati quantitativi sullo zinco dovranno essere eventualmente correlati con altri per le sostanze 5-idrossindoliche e per l'ATP.

Sarebbe fuor di luogo parlare in questa sede circa il possibile significato della presenza dello Zn. L'averlo trovato anche in *T. cristatus*, specie in cui non esistono sostanze 5-idrossindoliche orienta anche verso un possibile significato diverso da quello della chelazione prospettato

da COLBURN e MASS¹ tra sostanze fenoliche e ATP, chelazione che noi pensiamo possa ritenersi estendibile anche a sostanze 5-idrossindoliche.

D'altra parte esiste un enorme numero di dati sul significato che lo Zn può assumere negli esseri viventi, animali e vegetali, come attivatore di sistemi enzimatici e come costituente legato a proteine⁷. In particolare ricorderemo che per quanto non esista una comparabilità diretta tra i veleni degli anfibi e quelli dei rettili, DELEZENNE⁸ ha dimostrato la presenza di Zn nelle ghiandole velenose dei serpenti.

Zusammenfassung. Mit Hilfe der Farbreaktion mit Dithizon und polarographischer Analysen wurde die Anwesenheit von Zink im Gift von *Triton cristatus*, *Sala-*

mandra maculosa und *Bombinator pachypus* nachgewiesen. Die Möglichkeit einer Chelatbildung durch Zink wird diskutiert.

M. VIALI e L. BOLOGNANI

Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Pavia e Centro di Studio per l'Istochimica del C.N.R. e Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Pavia (Italia), 2 agosto 1966.

⁷ B. L. VALLEE, in *Mineral Metabolism* (Ed. C. L. COMAR and F. BRONNER, 1962), vol. II, p. 443.

⁸ C. DELEZENNE, *Annls Inst. Pasteur Lille* 33, 68 (1919).

The Role of Pyrophosphate and Alkaline Phosphatase in Skin Calcification (Calciophylaxis)

KMnO₄ and several other metal salts produce heterotopic calcifications when injected s.c. SELYE¹ called this mechanism direct calcification and the metal salts direct calcifiers. The deposition of calcium salts in skin calcification occurs in the collagenous tissue (SELYE¹) in the form of hydroxyapatite (GLIMCHER², POSNER³). This process of experimental calcification is, therefore, similar to the formation of normal bone. Using this type of calcification, we were able to test in vivo under experimental conditions the theory of FLEISCH and NEUMAN⁴ concerning the significance of pyrophosphate and alkaline phosphatase in the mineralization process of collagenous fibres.

Material and methods. Male and female Wistar rats weighing about 150 g were given 'Lats' diet (Lats, Germany) and tap water ad libitum throughout the experiment. 3 groups of rats, each containing 5 animals, were studied. The basic treatment for all animals consisted of a single s.c. injection of 0.2 mg KMnO₄ in 0.2 ml distilled water at 4 different sites on the back. As a result of this treatment, there appeared within 6 days visible and radiologically demonstrable calcifications at the sites of injection. 10 of the 15 animals received i.p. injections of 2.5 mg pyrophosphate (per 100 g rat) twice daily during the 6 day duration of the experiment (the pyrophosphate solution was adjusted with hydrochloric acid to pH 7.4). This treatment with pyrophosphate was found to be effective in preventing calcifications in group 2. The remaining 5 rats were injected s.c. with 16 U daily of alkaline phosphatase (dissolved in 0.5 ml water, pH 7.0) at the sites of previous KMnO₄ injections. Experimental procedure and results are shown in the Table.

Discussion. The s.c. injection of potassium permanganate produces an alteration of the connective tissue, causing the calcification of collagenous fibres. It seems probable that KMnO₄ has a depolymerizing effect on the ground substance of connective tissue (unpublished histochemical observations of SCHWARZ and DIEZEL⁵). As a result of this change in connective tissue structure, the permeability to extracellular phosphates and calcium increases and their diffusion to the collagenous fibres is facilitated.

The experiments described above show that the heterotopic skin calcification produced by potassium permanga-

nate may be prevented by pyrophosphate injections (attempts were not made to assess the lowest pyrophosphate dose necessary to produce this effect). These observations correspond well with the in vitro experiments of FLEISCH and NEUMAN⁴, who found that pyrophosphate in small amounts inhibits calcium phosphate nucleation and calcium phosphate precipitation. Similar observations were made by SCHIBLER and FLEISCH⁶, who supposed that

Group	Treatment (5 animals)	Result
I	Subcutaneous injection of 0.2 mg KMnO ₄ in 0.2 ml distilled water at 4 different locations on the back*	Visible and radiologically demonstrable calcifications at the sites of injection
II	Initial preparation of the skin sites as described above. In addition, these animals received i.p. injections of pyrophosphate (2.5 mg/100 g rat) twice daily*	No calcifications
III	Initial preparation of the skin sites and pyrophosphate treatment as described above. In addition, these animals received daily s.c. injections of alkaline phosphatase (Böhringer Mannheim) in a single dose of 16 U dissolved in water (pH 7.0) at the sites where the KMnO ₄ solution had previously been injected. As a control 0.5 ml of a 0.9% saline solution was injected at 1 of the 4 prepared skin sites*	Visible and radiologically demonstrable calcifications at the sites of injection with KMnO ₄ and alkaline phosphatase, but not in those control sites injected with KMnO ₄ and 0.9% saline solution

* The animals were sacrificed 6 days later.

¹ H. SELYE, *Calciophylaxis* (The University of Chicago Press, Chicago 1962).

² M. J. GLIMCHER, *Recent Prog. Horm. Res.* 20, 56 (1964).

³ P. POSNER, *Recent Prog. Horm. Res.* 20, 56 (1964).

⁴ H. FLEISCH and W. F. NEUMAN, *Am. J. Physiol.* 200, 1296 (1961).

⁵ G. SCHWARZ and B. P. DIEZEL, to be published.

⁶ D. SCHIBLER and H. FLEISCH, *Experientia* 22, 367 (1966).