

Fig. 2. Testis of a rat with early-estrogen syndrome by diethylstilbestrol. Seminiferous tubules lined only with spermatogonia and Sertoli-cells. In the lumen many multinucleated giant spermatoocytes. $\times 100$.

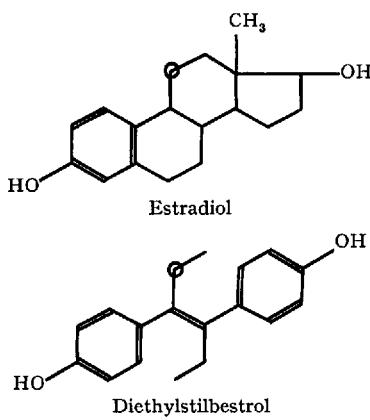


Fig. 3

heavy degenerative changes could be seen. In some tubules spermatogonia, spermatocytes, praespermatides, spermatides and spermatozoa, while in others only spermatogonia, sporadic spermatocytes and giant poly-nuclear cells were present (Figure 2). The basal membranes were thin and in the interstitium the loose connective tissue with interstitial Leydig cells could be found.

CAMPBELL⁴ recently assumed that, for all the steroids effective in inducing the early-steroid syndrome, the 11- β -H structure is common. This is taken into consideration with the supposed mechanism of their action at the origin of this syndrome. It has been shown in this paper that a comparable syndrome was induced also by diethylstilbestrol, thus confirming the experience of HALE⁵ and KINCL et al.⁶. Although this estrogen is not related to steroids structurally, it is possible to presume a similar mechanism of its action from certain similarity in the spatial location of the carbon atoms and spatial arrangement of the molecule (Figure 3).

Zusammenfassung. Typisches, durch Östrogene (frühpostnatale Periode) bei weiblichen und männlichen Ratten induziertes Syndrom, wird auch durch nicht-steroidales Östrogen, das Diäthylstilbostrol, ausgelöst. Auffallend wellenförmige Granulosazellenschicht in den grossen Graafschen Follikeln.

J. PRESL, J. JIRÁSEK,
J. HORSKÝ and M. HENZL

*Institute for the Care of Mother and Child, Prague
(Czechoslovakia), 14th November 1966.*

⁴ J. H. CAMPBELL, J. Endocr. 34, xiv (1966).

⁵ H. B. HALE, Endocrinology 35, 499 (1944).

⁶ F. A. KINCL, A. F. PR, M. MAQUEO, L. H. LASSO, A. ORIOL and R. I. DORFMAN, Acta endocr., Copenh. 49, 193 (1965).

Die Abhängigkeit der Ca⁺⁺-Aufnahme isolierter Mitochondrien des Herzmuskels von der Na⁺- und K⁺-Konzentration als mögliche Ursache der inotropen Digitaliswirkung

Die Kontraktilität der Muskelzelle wird nach heutigen Vorstellungen durch die wechselnde intrazelluläre Konzentration an freien Calciumionen gesteuert. Im Skelettmuskel erfolgt diese Änderung durch eine Bindung und Speicherung von Calcium in den Vesikeln des sarkoplastischen Retikulums. Dieser Mechanismus reicht jedoch für die Steuerung des Kontraktionszyklus im Herzmuskel nicht aus, so dass hier zusätzliche Bindungs- bzw. Austauschmechanismen für Ca⁺⁺ vorhanden sein müssen (HASSELBACH und WEBER¹; PORTZEHL²).

Aus Untersuchungen von SLATER und CLELAND³ ist bekannt, dass Lebermitochondrien Calcium speichern können. VASINGTON und MURPHY⁴ zeigten, dass die Ca⁺⁺-Bindung bei Nierenmitochondrien ein energieverbrauchender Prozess ist, und BRIERLEY et al.⁵ konnten an Mitochondrien des Herzmuskels einen Substrat-

abhängigen und einen ATP-abhängigen Ca⁺⁺-Transport unterscheiden.

Nachdem wir in früheren Untersuchungen festgestellt hatten, dass der K⁺-Transport an Mitochondrien des Herzmuskels durch Ca⁺⁺ gehemmt wird⁶, machten wir in den vorliegenden Untersuchungen die Beobachtung, dass die Ca⁺⁺-Aufnahme massgeblich durch den K⁺/Na⁺-Quotienten des Inkubationsmediums beeinflusst wird. Da bekannt ist, dass sich der intrazelluläre K⁺/Na⁺-Quotient während der Muskelkontraktion ändert, könnte

¹ W. HASSELBACH und H. WEBER, Naturwissenschaften 52, 121 (1965).

² H. PORTZEHL, Verh. dt. Ges. inn. Med. 71, 125 (1965).

³ E. C. SLATER und K. W. CLELAND, Biochem. J. 55, 566 (1953).

⁴ F. D. VASINGTON und J. V. MURPHY, J. biol. Chem. 237, 2670 (1962).

⁵ G. P. BRIERLEY, E. MURER und E. BACHMANN, Archs Biochem. Biophys. 105, 89 (1964).

⁶ H. DRANSFIELD und E. NOACK, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 253, 29 (1966).

eine wechselnde Ca^{++} -Bindung in den Mitochondrien an der physiologischen Steuerung des Kontraktionszyklus des Herzmuskels beteiligt sein.

Methodik. Herzmuskelgewebe wurde im Kühlraum ($2\text{--}4^\circ\text{C}$) mit der Schere zerkleinert, durch ein Metallsieb gepresst und im Potter-Elvehjem mit der 9fachen Menge einer $0,25\text{ M}$ Saccharoselösung, die 50 mM Imidazol-Puffer $\text{pH} = 6,8$ enthielt, homogenisiert. Das Homogenat wurde 5 min bei 600 g in der Christ-Zentrifuge und der erhaltene Überstand 10 min bei 10000 g in der Spinco zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in Imidazol gepufferter Saccharoselösung aufgenommen, so dass eine Mitochondriensuspension mit $1\text{--}2\text{ mg}$ Eiweiß pro ml entstand. Zur Messung des Ca^{++} -Transportes wurde die Mitochondriensuspension bei 25°C in dem 6fachen Volumen einer Lösung folgender Endkonzentrationen inkubiert: Natriumsuccinat $2,0\text{ mM}$, Dinatrium-ATP $3,0\text{ mM}$, Calciumchlorid ($\text{Ca}^{45}\text{:Ca}^{40} = 1:200$) $0,06\text{ mM}$, Imidazolpuffer ($\text{pH} = 6,8$) 50 mM , Saccharose 50 mM sowie Kalium- und Natriumchlorid in den angegebenen Konzentrationen. – Die Reaktion wurde durch Zugabe der Mitochondriensuspension gestartet. Zu verschiedenen Zeiten wurden je $1,5\text{ ml}$ des Inkubates abpipettiert und innerhalb von 4 sec durch ein Zellulosenitrat-Filter (Millipore oder Sartorius-Filter) gesaugt. Der Mitochondrienniederschlag wurde zusammen mit dem Filter aufgelöst und die darin enthaltene ^{45}Ca -Aktivität im Liquid-Scintillationszähler (Packard) bestimmt.

Ergebnisse. Werden Mitochondrien des Herzmuskels unter Zusatz von 120 mM K^+ und 8 mM Na^+ bei 25°C inkubiert, so findet innerhalb von 5 min eine maximale Ca^{++} -Aufnahme statt. Enthält das Inkubationsmedium dagegen äquimolare Mengen von K^+ und Na^+ , so ist die Ca^{++} -Aufnahme der Mitochondrien wesentlich geringer und beträgt nur etwa 30 % anstelle von etwa 50 % des zugesetzten ^{45}Ca . (Figur 1). In Kontrollansätzen ohne ATP und Succinat finden sich in den Mitochondrien bei einer Inkubationsdauer von 5–15 min nur etwa 5 % des zugesetzten ^{45}Ca .

In Figur 2 ist die prozentuale Änderung der Ca^{++} -Aufnahme unter dem Einfluss verschiedener K^+ - und Na^+ -Konzentrationen dargestellt, bezogen auf diejenige in einem äquimolaren K^+ - und Na^+ -Milieu (100%). Mit ansteigendem K^+ -Gehalt des Mediums wird die Ca^{++} -Aufnahme bis zu 180 % erhöht. Bei äquimolarer Na^+ - und K^+ -Konzentration ist die Ca^{++} -Aufnahme minimal

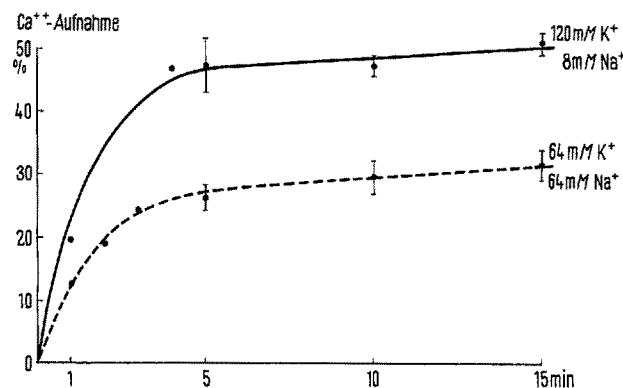


Fig. 1. Ca^{++} -Aufnahme isolierter Mitochondrien des Kaninchenherzens bei äquimolaler K^+ - und Na^+ -Konzentration bzw. überwiegender K^+ -Konzentration im Inkubationsmedium. Die Ordinate bedeutet die Ca^{++} -Aufnahme in Prozent des dem Inkubationsmedium zugesetzten ^{45}Ca . Die Säulen stellen die Mittelwerte und mittleren Fehler der Mittelwerte ($x \pm S_x$) von 6 Versuchen dar.

und steigt bei Überwiegen der Na^+ -Konzentration wieder an. Die dargestellte Kurve zeigt also, dass sich die Änderung der Ionenkonzentration zwischen 100 und 120 mM K^+ bzw. 28–8 mM Na^+ am stärksten auf die Ca^{++} -Aufnahme der Mitochondrien auswirkt. Dabei ist allerdings nicht der absolute Ionengehalt entscheidend, sondern das Verhältnis K^+/Na^+ ; vermindert man im Inkubationsmedium die Alkalionenkonzentration von 128 mM auf 88 mM , so ist die Ca^{++} -Aufnahme bei hoher K^+ -Konzentration (80 mM) ebenfalls auf etwa 180 % gegenüber der äquimolaren K^+ und Na^+ -Konzentration gesteigert (Figur 2).

K-Strophanthin hemmt – wie frühere Untersuchungen ergaben⁷ – in Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-7} M die $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktivierte Membran-ATPase des Meerschweinch- und Kaninchenherzens. Die Ca^{++} -Aufnahme der isolierten Mitochondrien wird durch diese therapeutisch in Frage kommenden Strophanthin-Konzentrationen nicht beeinflusst (Tabelle).

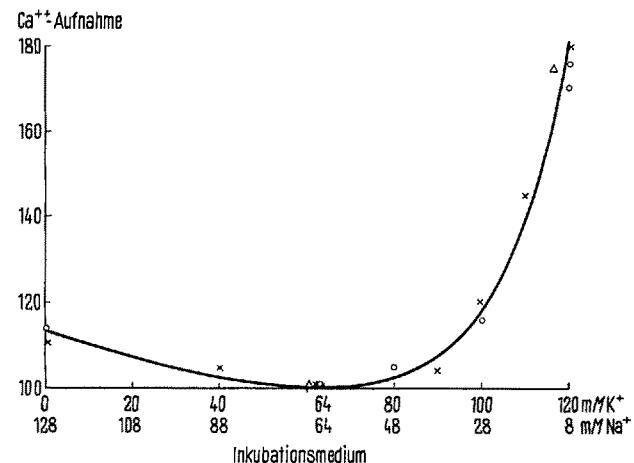


Fig. 2. Abhängigkeit der Ca^{++} -Aufnahme isolierter Mitochondrien des Herzmuskelgewebes von dem Verhältnis der K^+ - und Na^+ -Konzentration im Inkubationsmedium. Ordinate: Prozentuale Zunahme des Ca^{++} -Gehaltes der Mitochondrien gegenüber Ansätzen mit äquimolaren K^+ - und Na^+ -Konzentration (100%). Inkubationsdauer 5 min. + = Mitochondrien aus Kaninchenherzen; O = Mitochondrien aus Rinderherzen; Δ = Mitochondrien aus Kaninchenherzen bei einem Inkubationsmedium von 80 mM K^+ und 8 mM Na^+ bzw. 44 mM K^+ und 44 mM Na^+ .

$^{45}\text{Ca}^{++}$ -Aufnahme in %	Inkubationsmedium		
	k-Strophanthin M	120 mM K^+ 8 mM Na^+	64 mM K^+ 64 mM Na^+
10^{-5}		$48,5 \pm 5,1$	$33,0 \pm 3,9$
10^{-6}		$43,9 \pm 2,8$	$32,8 \pm 0,5$
10^{-7}		$49,8 \pm 5,4$	$32,0 \pm 1,3$
		$44,7 \pm 3,1$	$32,6 \pm 1,7$

$^{45}\text{Ca}^{++}$ -Aufnahme der Mitochondrien des Kaninchenherzens in % des dem Medium zugesetzten $^{45}\text{Ca}^{++}$. Mittelwerte und mittlerer Fehler der Mittelwerte von 3–4 Versuchen.

⁷ H. DRANSFELD, K. GREEFF, H. BERGER und V. CAUTIUS, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 254, 225 (1966).

Bemerkungen. Die wesentlichste Wirkung der Digitalisglykoside beruht nach heutigen Vorstellungen auf einer Änderung des intrazellulären Ca^{++} , K^+ - und Na^+ -Gehaltes. Wie Untersuchungen von HOLLAND et al.⁸ sowie KLAUS et al.⁹ ergaben, wird die ionisierte, austauschbare Calciumfraktion unter der Einwirkung der Digitalisglykoside erhöht; der Mechanismus ist aber bis heute unbekannt. Andererseits beeinflussen die Digitalisglykoside den aktiven K^+ - und Na^+ -Transport an der Zellmembran durch eine Hemmung der hierfür notwendigen Transport-ATPase; hierdurch wird der intrazelluläre K^+ -Gehalt vermindert und der Na^+ -Gehalt erhöht¹⁰⁻¹². Für die Annahme, dass diese Transport-ATPase der primäre Angriffspunkt der Digitalisglykoside ist, sprechen 2 wesentliche Befunde: (1) ist die Membran-ATPase des Herzmuskels um mehrere Zehnerpotenzen empfindlicher als die des Skelettmuskels, so dass die seit langem bekannte Selektivität der Digitalisglykoside für das Herz eine Grundlage findet⁷ und (2) ist die Empfindlichkeit der Membran-ATPase des Herzmuskels verschiedener Tierarten der jeweiligen therapeutischen bzw. toxischen Wirkung des betreffenden Glykosids korreliert^{13,14}.

Die vorliegenden Untersuchungen haben ergeben, dass die Ca^{++} -Aufnahme isolierter Mitochondrien des Herzmuskels durch k-Strophanthin nicht beeinflusst wird, wohl aber durch eine Änderung der Na^+ - und K^+ -Konzentration im Inkubationsmedium. Aufgrund dieser Befunde lässt sich die positiv inotrope Wirkung der Digitalisglykoside vielleicht folgendermassen erklären: primär wird in der Zelle durch eine Hemmung der Membran- bzw. Transport-ATPase der K^+ -Gehalt vermindert und der Na^+ -Gehalt erhöht oder die Restitution des K^+/Na^+ -Quotienten während der Diastole verzögert. Sekundär wird mit der Abnahme des K^+/Na^+ -Quotienten die Bindungsfähigkeit der Mitochondrien für Ca^{++} vermindert und damit die ionisierte, austauschbare Ca^{++} -

Fraktion im Cytoplasma erhöht, so dass die Einwirkung der Calciumionen auf die kontraktile Eiweisselemente oder andere Enzymsysteme verstärkt oder verlängert ist.

Summary. In isolated mitochondria of heart muscle from rabbits and oxen there is, under suitable conditions, an accumulation of Ca^{++} , which is significantly enhanced by elevating the K^+/Na^+ quotient of the incubation medium. K-strophanthine (10^{-6} - 10^{-7}) does not influence the accumulation of Ca^{++} by the mitochondria of heart muscle. Therefore the intracellular increase in exchangeable Ca^{++} observed after digitalis-glycosides could be explained by a decrease of the intracellular K^+/Na^+ quotient, which is caused by inhibition of the membrane ATPase and diminishes the capacity for Ca^{++} accumulation in mitochondria.

H. DRANSFELD, K. GREEFF, D. HESS
und A. SCHORN

*Pharmakologisches Institut der Universität,
4 Düsseldorf (Deutschland), 30. Dezember 1966.*

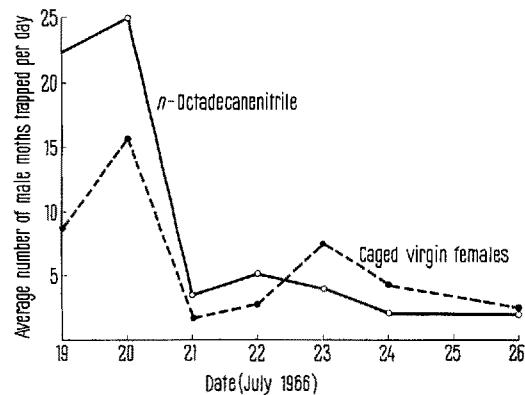
- ⁸ W. C. HOLLAND und H. LÜLLMANN, Fedn Proc. Fedn Am. Soc exp. Biol. 21, 126 (1962).
- ⁹ W. KLAUS und G. KUSCHINSKY, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmac. 244, 237 (1962).
- ¹⁰ I. M. GLYNN, Pharmac. Rev. 16, 381 (1964).
- ¹¹ K. GREEFF, Klin. Physiol. 1, 340 (1963).
- ¹² K. REPKE und H. J. PORTIUS, Experientia 19, 452 (1963).
- ¹³ H. DRANSFELD, E. GALETKE und K. GREEFF, Archs int. Pharmacodyn. Thér. (im Druck).
- ¹⁴ K. REPKE, M. EST und H. J. PORTIUS, Biochem. Pharmac. 14, 1785 (1965).

A Synthetic Attractant for the Male Spruce Budworm Moth *Choristoneura fumiferana* (Clem.)

In July of 1965 we found that technical grade palmitic acid was slightly attractive to the male spruce budworm moth *Choristoneura fumiferana* (Clem.). Material separated by vapour phase fractionation of a steam distillate from the crude acid proved to have superior luring ability. One such fraction was competitive in attractiveness with single caged virgin female insects in the field.

We have recently isolated 2 mg of a crystalline aliphatic nitrile from 1.5 kg of commercial palmitic acid¹. The mass spectrum of this trace impurity displayed a molecular ion of mass 265 and a fission pattern indicative of *n*-octadecanenitrile. The identity was confirmed by comparison of the compound with an authentic synthetic sample of *n*-octadecanenitrile.

The Figure shows the results of preliminary field bioassays² on this compound carried out at Rocky Brook, New Brunswick, in late July 1966. 2 moth traps baited with 1 mg pure crystalline *n*-octadecanenitrile were exposed on July 19 and 20. 6 additional traps baited with 1 mg of the synthetic nitrile were exposed from July 21 till July 26, when moth activity became minimal. 3 other



Comparison of the average number of male spruce budworm moths lured by *n*-octadecanenitrile and by single caged virgin female moths. Field test results (Rocky Brook, N.B., Canada).

- ¹ Palmitic acid (90%) obtained from Aldrich Chemical Co. Ltd., Milwaukee (Wisconsin, USA).
- ² The methods of field bioassay and collection of virgin female moth exudants have been described in an article by J. A. FINDLAY and D. R. MACDONALD, Chemn Can. 18, 47 (1966).