

stark erhöht. Die aktivierende Wirkung des Stoffes ist der Menge des verabreichten Östrogens direkt proportional. Der Stoff selbst ist nicht östrogen aktiv. Unsere Befunde klären die älteren Angaben von BICKOFF et al.⁷, dass Luzernemehl manchmal die Aktivität der Östrogene potenzieren kann. Sie ähneln auch den früheren Befunden von IWANOFF⁸, der feststellte, dass verschiedene Pflanzen Substanzen enthalten, welche die Aktivität von Östrogenen steigern. Zu solchen Pflanzen muss nun auch die Luzerne gerechnet werden.

Summary. In the residuum from 0.1*n* HCl extract of alfalfa obtained by precipitation with lead acetate and

H₂S and evaporation to dryness, a substance is present which potentiates the activity of oestradioldipropionate. This potentiation of oestrogen activity is directly proportional to the amount of applied oestrogen.

J. CHURY

Biologisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Brno (CSSR), 22. Juni 1967.

⁸ N. IWANOFF, *Acta vet. hung.* 6, 55 (1956).

Physiological Activities of Gluconyl Peptides

In an earlier communication^{1, 2} in vivo reactions of D-gluconyl-L-tyrosine were reported: thrombolysis and increased vascular permeability. Other gluconyl peptides have now been found to be effective. By the method used previously² they were prepared with L-alanine, L-leucine, L-norleucine, L-glutamic acid, L-lysine, and ϵ -aminocaproic acid. There was considerable variation in amount of product, the maximum yield being obtained with ϵ -aminocaproic acid. Aqueous solutions of the compounds were injected i.v. into dogs in which blood clots had been induced in femoral arteries³. Gluconyl- ϵ -aminocaproic acid proved to be the most potent agent, 20 mg in 1 ml bringing about lysis of blood clots in dogs weighing 12–13 kg 15 min after systemic administration.

In vitro, none of the gluconyl peptides were able to lyse fibrin; however, they were found to inhibit the formation of fibrin from fibrinogen and thrombin. Gluconyl compound, 1 U of human thrombin, and 0.3 mg of bovine fibrinogen, all dissolved in 0.2 ml of saline, were allowed to react at room temperature. Clotting was prevented by 0.05 mg of gluconyl- ϵ -aminocaproic acid, 0.2 mg of gluconyl-leucine, and 0.4 mg of gluconyl-tyrosine respectively. In each instance the anticoagulant effect was overcome by the incorporation of 0.065 mg of ϵ -aminocaproic acid or 0.5 mg of sodium ascorbate in the reaction mixture, though there was a delay in clot formation as compared with thrombin-fibrinogen controls.

Red blood cells proved to be suitable for an in vitro study of the permeability effect. One-tenth ml of 1% suspensions of sheep cells, mouse cells, and human cells respectively were mixed with 0.1 ml of dilutions of gluconyl- ϵ -aminocaproic acid in saline and incubated in a 37°C water bath for 60 min. Complete lysis of sheep and mouse red blood cells required 0.2 mg of the gluconyl compound, of human red blood cells 0.5 mg. This was consistent with cells from different individuals. Lysis of human red blood cells was entirely prevented with 0.5 mg of sodium ascorbate or 0.26 mg of ϵ -aminocaproic acid but not with 10 times as much glycine or alanine or lysine.

This finding led to an exploration of the effect of gluconyl peptides on bacterial cells. Several such compounds proved to be bactericidal for a variety of organisms suspended in distilled water without added nutrients. The antibacterial effect was also investigated in the presence of heart infusion broth, which was inoculated with 5×10^6 organisms of a strain of *Staphylococcus albus* and incubated at 37°C over night. Growth was observed when 0.2 ml of the broth

was added to 1 mg of gluconyl- ϵ -aminocaproic acid in 0.1 ml of distilled water. One mg with 0.1 ml of broth prevented the bacteria from multiplying, while 5 mg with the same amount of broth was bactericidal. To inhibit bacterial reproduction with gluconyl-leucine and gluconyl-lysine, 2 mg of the respective compound were required with 0.1 ml of broth. The bacteriostatic activity of any of the 3 gluconyl peptides was overcome with 1.3 mg of ϵ -aminocaproic acid but not with 10 times as much alanine or lysine nor with sodium ascorbate, which was shown itself to be antibacterial in the concentration needed in the tests.

A summary of the 3 in vitro tests is presented in the accompanying Table.

The results here reported may serve to shed some light on the mode of action of gluconyl peptides. Both fibrin and the outer layer of cell membranes are glycoproteins. Lysis could be due to the replacement of their carbohydrate moieties by gluconyl groups, made possible through the action of specific enzymes. Of the 2 antagonists studied, ϵ -aminocaproic acid is generally recognized as an effective anti-fibrinolytic and anti-inflammatory

Physiological activities of gluconyl- ϵ -aminocaproic acid, counteracted by ϵ -aminocaproic acid and sodium ascorbate

	Anti-coagulant	Haemolytic	Bacteriostatic
Activity units ^a of gluconyl- ϵ -aminocaproic acid	0.02	0.16	0.32
Counteractivity units ^b of ϵ -aminocaproic acid	0.05	0.20	1.00
Counteractivity units ^b of sodium ascorbate	0.23	0.23	—

^a Smallest amounts in ml of $10^{-2}M$ concentrations bringing about effects listed under conditions described in the text. ^b Smallest amounts in ml of $10^{-2}M$ concentrations nullifying 1 activity unit.

¹ P. H. KOPFER, *Nature* 217, 1417 (1966).

² M. IACOBELLIS, *Archs Biochem. Biophys.* 59, 199 (1955).

³ M. J. TSAPOGAS and P. T. FLUTE, *Br. med. Bull.* 20, 223 (1964).

compound. It would seem to be a competitive inhibitor of the gluconyl compounds. In the case of the second antagonist this appears less evident. There is certainly a marked structural similarity between gluconic and ascorbic acids. The antihæmolytic action of vitamin C would fit in well with its known function in the body. On the other hand, much larger amounts than expected were required to counteract the anticoagulant effect of gluconyl peptides, pointing to a complex relationship between the 2 compounds. Ascorbic acid has been reported to shorten clotting time in rabbits and man⁴, but the degree to which vascular integrity is related to altered blood coagulability has not yet been determined⁵.

Zusammenfassung. D-gluconyl-ε-aminocaprinsäure und andere Glyconylpeptide wirken als Anticoagulans durch

Hemmung der Fibrinbildung aus Fibrinogen, hämolyisieren rote Blutkörperchen und haben einen bakteriostatischen Effekt. Es handelt sich möglicherweise um eine Wirkung auf Glukoproteine mit Austausch von Kohlenhydratkomponenten; Zugabe von ε-Aminocaprinsäure ist imstande, die Wirkung aufzuheben.

P. H. KOPFER

Biology Department, Washburn University, Topeka (Kansas 66621, USA), 19 June 1967.

⁴ S. G. APTEKAR and K. M. LORIE, Klin. Med., Wien 36, 121 (1958).

⁵ P. G. DAYTON and M. WEINER, Ann. N.Y. Acad. Sci. 92, 302 (1961).

Effets de quelques anesthésiques sur les Gastrotriches

Les zoologistes préoccupés de l'étude des Gastrotriches se sont toujours heurtés, lors de la réalisation de leurs montages microscopiques, au problème de la difficulté d'obtention d'animaux fixables en état de parfaite décontraction. L'addition d'un fixateur a toujours pour effet une contraction rapide et généralement intense de l'animal. Si le fixateur utilisé est brutal (Picroformol de Bouin, formol pur ou à 70°, fixateur de Navachine), la morphologie de l'animal contracté est par surcroît souvent altérée; si ce fixateur a un effet moins instantané (Bouin alcoolique, Alcool à 70°, Perenyi, Formol à 10°, Bouin Hollande, combinaisons diverses de formol et d'acide acétique), l'animal, après de brèves contorsions, se rétracte et s'enroule en une boule serrée. Après usage des procédés précédents, nous n'avons obtenu quelques succès (avec un pourcentage extrêmement faible) qu'avec le formol pur et à 70°.

Nous avons obtenu dans plusieurs cas des Gastrotriches marins immobilisés en parfaite extension, après évaporation partielle de la goutte d'eau de mer les renfermant, vraisemblablement à la suite de l'augmentation progressive de la teneur en NaCl du milieu. Une telle méthode est toutefois particulièrement hasardeuse, et il s'avérerait donc nécessaire de tenter de mettre au point une technique rationnelle d'anesthésie préalable, permettant l'obtention d'animaux à morphologie non altérée et ne réagissant plus à l'addition du fixateur.

Dans sa monographie fondamentale des Gastrotriches, REMANE¹, synthétisant les connaissances acquises sur les essais d'anesthésie de ces animaux, signale la facilité d'immobilisation des espèces dulcicoles sous l'effet de la cocaïne («1% im Wasser oder 5% Alkohol»), substance donnant par contre des résultats décevants à propos des espèces marines; cet auteur, après un certain nombre de tentatives, finit par conclure que les moins mauvais résultats étaient la conséquence de l'addition «einer Spur Formalin, so dass etwa eine Konzentration von 0,01% entsteht. Die Tiere sterben allmählich ab und bleiben dabei etwa $\frac{3}{4}$ gestreckt».

En raison de la réglementation de la vente de la cocaïne, et n'ayant d'autre part pas pu obtenir de résultats vraiment satisfaisants avec le Formol, l'alcool² et l'acétate

d'éthyle très dilués – si nous avons obtenu quelques succès après l'immersion d'espèces marines et d'eau douce dans de l'eau seulement saumâtre – nous nous sommes orienté avec des fortunes diverses vers plusieurs solutions commerciales et spécialités pharmaceutiques.

Nos résultats sont résumés dans le Tableau ci-joint qui amène quelques remarques et compléments.

(1) *Le chlorure de Magnésium (MgCl₂)*. Ce sel a été utilisé en solution approximativement isotonique à l'eau de mer. L'effet (réversible) est efficace et rapide chez la plupart des espèces (Chaetonotoides, *Dactylopodalia*, *Paradasys*), plus lent et non nécessairement acquis chez les Thaumastodermatidés, souvent inefficace dans le cas de *Turbanella cornuta* Remane. Les seules altérations morphologiques résultant de l'addition de chlorure de Magnésium isotonique à l'eau de mer sont, par suite du relâche-

Anesthésique	Chaetonotoides		Macrodasoyoides		
	marins	d'eau douce	Turbanellidés	Thaumastodermatidés	Autres familles
MgCl ₂	+++		+	+++*	+++
MgSO ₄			++		
eau douce			+		
eau de mer			+		
MS 222	-	++	-	-	-
Xylocaïne	++*	0	+	0	+
Flaxédil	++*		-		

+++ Anesthésie en état de parfaite décontraction; ++ anesthésie en état de faible contraction; + résultats très variables suivant les individus; - anesthésie accompagnée d'une importante déformation morphologique; 0 résultats complètement décevants. * Forte concentration nécessaire.

¹ A. REMANE, in *Bronns Klassen und Ordnungen des Tierreichs* (Akademische Verlagsgesellschaft 1936) IV,2, I,2, p. 235.

² Mr. P. DE BEAUCHAMP nous a très obligeamment précisé (communication orale) qu'il avait pu fixer en état de décontraction des Gastrotriches d'eau douce du genre *Neogosse* par simple traitement à l'alcool.