

La DL_{50} pour le caneton âgé d'un jour n'a pas été déterminée. L'inoculation à cet animal de doses variant de 100 à 250 μ g a un effet léthal en moins de 7 jours. A l'autopsie on ne relève aucune lésion caractéristique; l'examen histopathologique du tissu hépatique montre des altérations correspondant à une stéatose de type banal.

Plusieurs essais ont montré que la production in vitro de nidulotoxine était obtenue en utilisant des substrats différents du milieu synthétique de Czapek, modifié selon BRIAN et al.⁵ et additionné d'asparagine. La présence de coton dans le milieu liquide a pour seul effet de favoriser un développement rapide et abondant du mycélium, à la surface du milieu.

La nidulotoxine est le principal, sinon l'unique, métabolite toxique contenu dans les extraits de cultures d'*A. nidulans*; en effet l'administration au caneton et l'inoculation dans l'œuf fécondé des différentes fractions chromatographiques obtenues à partir de ces extraits et ne contenant pas de nidulotoxine n'ont pas permis d'observer de phénomènes toxiques nets.

MOREAU⁶ a émis l'hypothèse que la toxicité des produits végétaux sur lesquels s'est développé *A. nidulans* pouvait être reliée à la synthèse, par le champignon, d'acide kojique ou d'un pigment anthraquinonique, l'asperthécine, étudié par HOWARD et RAISTRICK⁷ et NEELAKANTAN, POCKER et RAISTRICK⁸. Différents caractères propres à la nidulotoxine permettent d'affirmer que cette substance est différente de l'acide kojique et de l'asperthécine. La

nidulotoxine ne peut d'autre part être confondue avec la niduline et la noriduline^{9,10} depsidones élaborées par certains *A. nidulans* et douées d'activité antibiotique^{11,12}.

Zusammenfassung. Isolierung, Charakterisierung, Reinigung und toxische Wirkung eines Toxins aus *Aspergillus nidulans* Wint.

P. LAFONT, J. LAFONT
et C. FRAYSSINET

*Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer,
F-94 Villejuif et*

*I.N.S.E.R.M., Laboratoire de Toxicologie Alimentaire,
B. postale 40, F-78 Le Vésinet (France), 8 août 1969.*

⁶ C. MOREAU, *Moisissures toxiques dans l'alimentation* (Ed. P. CHEVALIER; Paris 1968).

⁷ B. H. HOWARD et H. RAISTRICK, *Biochem. J.* 59, 475 (1955).

⁸ S. NEELAKANTAN, A. POCKER et H. RAISTRICK, *Biochem. J.* 64, 234 (1957).

⁹ F. M. DEAN, J. C. ROBERTS et A. ROBERTSON, *J. chem. Soc.* (1954), 1432.

¹⁰ F. M. DEAN, A. D. ERNI et A. ROBERTSON, *J. chem. Soc.* (1956), 3545.

¹¹ Ce travail a bénéficié d'une aide financière de contrats de recherches de l'Action Concertée «Nutrition».

¹² Les auteurs expriment leur gratitude à Messieurs M. GAILLARDIN et R. GUERRY pour leur assistance technique.

Noradrenalin-Freisetzung aus dem Hypothalamus in vitro

Die Abgabe von Noradrenalin aus subzellulären, aminspeichernden Partikeln des Hypothalamus wird sowohl durch Kalzium als auch durch Acetylcholin stark erhöht¹. Versuche an Nebennieren zeigten, dass Kalzium-Ionen und Acetylcholin die Adrenalin-Freisetzung aus den intakten Nebennierenmarkzellen vermehren, während die Amin-Abgabe aus den subzellulären Vesikeln durch Kalzium, nicht aber durch Acetylcholin erhöht werden kann²⁻⁴. Es wird postuliert, dass sowohl Kalzium als auch Acetylcholin für die physiologische Sekretion des Hormons von Bedeutung sind. Um festzustellen, ob durch die beiden Stoffe auch aus den intakten Zellen des Zentralnervensystems die Amin-Abgabe gesteigert wird, wurden Hypothalami präpariert und in vitro mit Kalzium und Carbachol inkubiert. Anstatt Acetylcholin wurde Carbachol verwendet, da es durch die Cholinesterase kaum abgebaut wird.

Methoden. Ratten wurden bei 0°C dekapitiert, die Gehirne sofort entnommen und die Hypothalami präpariert. Jeder Ansatz enthielt 10 Hypothalami und 10 ml Ringer-Lösung. Kalzium und Carbachol wurden in Ringer-Lösung gelöst. Die Ansätze wurden 20 min lang bei 37°C unter Schütteln (Frequenz: 100/min) inkubiert und während der Inkubation mit Karbogensgas durchperlt. Die nicht inkubierten Kontrollen wurden sofort, die Inkubationsansätze nach der Inkubation 30 min lang mit 2000 g bei 0°C zentrifugiert, die Rückstände mit 8 ml 0,4 N HClO₄ extrahiert und nach erneutem Zentrifugieren im Überstand die Amine⁵, im Rückstand das Eiweiss⁶ bestimmt. In einigen Versuchen wurden die Hypothalami in EDTA-haltiger Ringer-Lösung (10⁻³ M) suspendiert; nach 10 min langem Stehen bei 0°C wurden die Ansätze zentrifugiert, die Hypothalami mit EDTA-freier Ringer-Lösung versetzt und anschliessend inkubiert. Der Noradrenalin-Gehalt der Ansätze wurde pro Miligramm Ei-

weiss berechnet. Als Ausgangswert für die Berechnung der prozentualen Noradrenalin-Freisetzung diente der Noradrenalin-Gehalt pro Miligramm Eiweiss der Kontrollansätze (0°C, 0 min). Jeder Wert eines Versuches entspricht dem Mittelwert drei gleichartiger Ansätze.

Versuche. Um festzustellen, ob Kalzium-Ionen die Abgabe von Noradrenalin aus den Hypothalami beeinflussen, wurden sie in kalziumfreier und kalziumhaltiger Ringer-Lösung 20 min lang bei 37°C inkubiert. Die spontane Noradrenalin-Freisetzung aus den intakten Hypothalami in Abwesenheit von Kalzium-Ionen ist sehr gering; sie beträgt 5,4% (Figur). Wird jedoch der Ringer-Lösung Kalzium als Chlorid zugegeben (5 × 10⁻³ M), so wird die Abgabe des Amins stark erhöht (17,9%). Somit verursacht die verwendete Kalzium-Konzentration eine mehr als 200prozentige Steigerung der spontanen Noradrenalin-Abgabe.

Um die Wirkung des Carbachols auf die Amin-Freisetzung zu untersuchen, wurden die Hypothalami in kalziumhaltiger Ringer-Lösung inkubiert. Die hohe Noradrenalin-Freisetzung der Kontrollansätze ist auf die Gegenwart von Kalzium-Ionen zurückzuführen. Carbachol (1,4 × 10⁻⁴ M) vermag die Amin-Abgabe statistisch signifikant (um 53,9%) zu steigern.

¹ A. PHILIPP und H. PRZUNTEK, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 258, 238 (1967).

² W. W. DOUGLAS und R. P. RUBIN, *J. Physiol.* 159, 40 (1961).

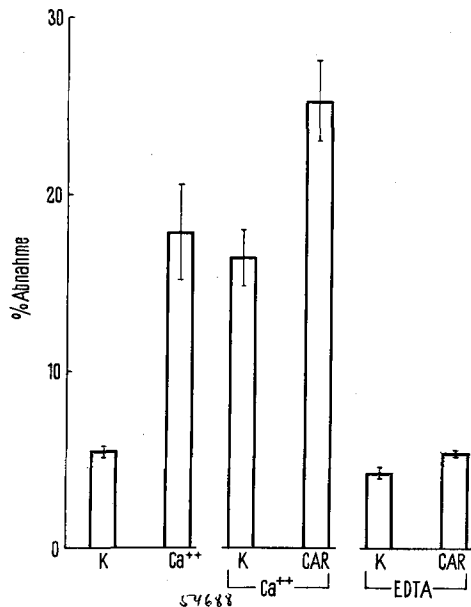
³ H. BLASCHKO, P. HAGEN und A. D. WELCH, *J. Physiol.* 129, 27 (1955).

⁴ A. PHILIPP und H. J. SCHÜMANN, *Experientia* 18, 138 (1962).

⁵ J. F. PALMER, *J. Pharm. Pharmacol.* 15, 777 (1963).

⁶ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).

In einer Reihe von Versuchen wurden die Hypothalami mit EDTA ($10^{-3}M$) vorbehandelt und anschliessend in Ringer-Lösung suspendiert. Die spontane Amin-Freisetzung ist unter diesen Bedingungen etwas geringer, während die Wirkung des Carbachols auf die Noradrenalin-Freisetzung praktisch aufgehoben wird. Carbachol ist also auch in der Lage, die Amin-Abgabe zu erhöhen; seine Wirkung ist jedoch kalziumabhängig.



Einfluss von Kalzium und Acetylcholin auf die Noradrenalin-Freisetzung. K, Kontrollen; Ca^{++} , $5 \times 10^{-3}M$ Kalzium-Chlorid; CAR, $1,4 \times 10^{-4}M$ Carbachol. EDTA, $10^{-3}M$. Inkubation: 20 min bei $37^\circ C$. Mittelwerte von 4–5 Versuchen und deren mittlere Fehler.

Demnach setzen Kalzium-Ionen und Acetylcholin nicht nur aus subzellulären Partikeln, sondern auch aus den intakten Zellen des Hypothalamus Amine frei. Auf Grund der vorliegenden Versuche kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass durch diese Stoffe auch zytoplasmatisches Amin freigesetzt wird. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die durch Acetylcholin bedingte Depolarisation der Zellmembran den Einstrom von Kalzium-Ionen ermöglicht, die dann das subzelluläre gespeicherte Noradrenalin freisetzen¹. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, dass im Hypothalamus Noradrenalin zum grössten Teil subzellulär gespeichert vorliegt^{7,1}.

Da in vivo Kalzium und Acetylcholin die Abgabe von Noradrenalin aus dem Hypothalamus ebenfalls stark erhöhen⁸, kann angenommen werden, dass auch im Zentralnervensystem das aus den cholinergen Neuronen freiwerdende Acetylcholin die Abgabe des Amins aus den noradrenergen Neuronen erhöht.

Summary. Rat hypothalami were isolated and incubated at $37^\circ C$ in Ringer solution. Both calcium and acetylcholine enhance the release of noradrenaline. The effect of acetylcholine is dependent on the presence of calcium ions.

H. PRZUNTEK und A. PHILIPPU⁹

Pharmakologisches Institut,
Klinikum Essen der Ruhr-Universität,
D-43 Essen (Deutschland), 2. Juli 1969.

⁷ E. DE ROBERTIS, A. PELLEGRINO DE IRALDI, G. RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ und L. M. ZIEHER, *Life Sci.* 4, 193 (1965).

⁸ A. PHILIPPU, G. HEYD und A. BURGER, *Eur. J. Pharmac.*, im Druck (1969).

⁹ Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Kinins and Kininogen in Endotoxin Shock¹

The main pharmacological effects of kinins are: smooth muscle contraction², vasodilatation³, increase of microvascular permeability⁴, production of pain⁵, and perhaps the emigration of leukocytes⁶. There have been numerous investigations to determine whether kinins can be responsible for similar conditions in the presence of certain physiological or pathological situations⁷.

The participation of kinins in the normal vasodilation mechanism of the salivary glands and the pancreas, and in thermal vasodilatation has been postulated^{8–10}. Thermal vasodilation and exercise in human beings do not increase the content of kinins in the venous effluent from the vasodilated area^{11,12}. An increase of plasma kinins has been reported in acute necrosis of the pancreas¹³. In patients with the carcinoid syndrome, the vasodilatation flush was accompanied by an increase of kinins in hepatic venous blood¹⁴.

In 1950, BERALDO¹⁵ reported the presence of the free bradykinin in the blood of dogs previously injected with peptone. Since then, although much research has been

done to elucidate the role of the kinins in shock, results have been contradictory^{16–18}. This study further investigates the possible role of the kinin system in shock produced by endotoxin in dogs.

Materials and methods. In Vitro Experiments. 3 aliquots of 50 ml heparinized venous blood were incubated with 2 mg of endotoxin¹⁹ at $37^\circ C$ for 0, 2.5 and 15 min. Two 50 ml aliquots which did not contain endotoxin were incubated for 0 and 15 min at $37^\circ C$ to serve as controls. Following the incubation period we took small aliquots from each sample and determined the bradykininogen content of the plasma, according to the method of FASCILOLO et al.²⁰. The remainder of each sample was then precipitated with 4 vol. of 96% ethanol and processed to estimate the concentration of kinins after the method of BINIA et al.²¹.

In Vivo Experiments. 9 mongrel dogs were anaesthetized i.v. with Nembutal, 30 mg/kg of body weight. Blood pressure was recorded with a mercury manometer connected to the carotid artery. Blood samples were ob-