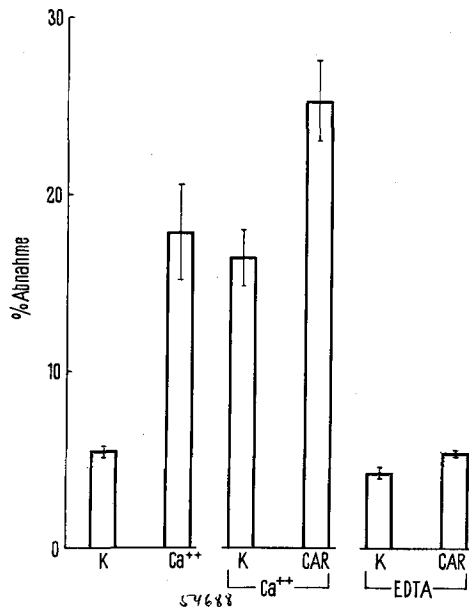


In einer Reihe von Versuchen wurden die Hypothalami mit EDTA ($10^{-3}M$) vorbehandelt und anschliessend in Ringer-Lösung suspendiert. Die spontane Amin-Freisetzung ist unter diesen Bedingungen etwas geringer, während die Wirkung des Carbachols auf die Noradrenalin-Freisetzung praktisch aufgehoben wird.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

tained from a polyethylene catheter whose tip lay adjacent to the right atrium.

Shock was induced in 5 of these dogs by injection of endotoxin (2 mg/kg, i.v.). From samples of venous blood taken before, and at 10, 60 and 120 min after the endotoxin injection, we estimated the kinins and bradykininogen content.

To determine whether the kinins estimation method could effectively detect the release of these substances in circulatory blood, 2 dogs were injected with hog pancreas Kallikrein (Padutine, Bayer). One was injected with 40 units, the other with 80 units i.v. Venous blood was drawn before, and at 3, 7 and 15 min after injection for kinins estimation.

The effect of blood sampling on plasma kinin and bradykininogen levels was determined by drawing 50 ml aliquots of venous blood from 2 dogs at 0, 10, 60 and 120 min. A small blood sample was taken before each blood-drawing and its bradykininogen concentration estimated.

Results. In the *in vitro* experiments, when blood was incubated with or without endotoxin, no significant difference in the bradykininogen content of plasma existed. No detectable amounts of kinins were found in any of the samples.

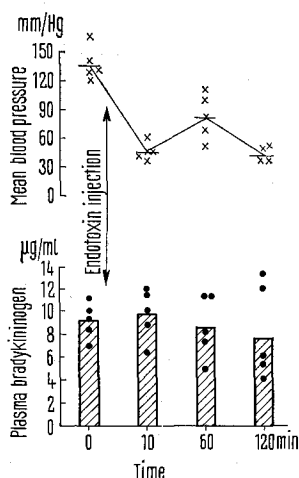


Fig. 1. Plasma bradykininogen and arterial pressure, before endotoxin injection, and at 10, 60 and 120 min after endotoxin injection.

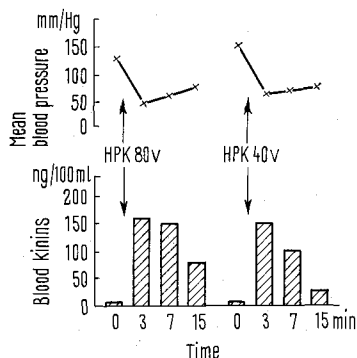


Fig. 2. Arterial pressure and blood kinins before and at 3, 7 and 15 min after injection of 80 and 40 U of hog pancreas Kallikrein (HPK).

In the *in vivo* experiments, a rapid fall in mean arterial pressure occurred after endotoxin administration, followed by a period of increase in arterial pressure to subnormal levels, and then a second decrease in mean pressure. In all blood samples, we found no detectable kinins, nor were there significant differences in the kininogen content of plasma obtained before and after endotoxin injections, though a wider dispersion was found after endotoxin injection (Figure 1). Kallikrein injection produced a profound fall in arterial pressure which coincided with a release of kinins (Figure 2). Blood sampling did not affect the bradykininogen and kinin content.

Discussion. Incubation of endotoxin with blood samples failed to release kinins. Furthermore, we found no amount of kinins released after i.v. injection of endotoxin in the dog. The kinin content of venous blood was below the sensitivity of the method employed (0.1 µg/100 ml of blood). The experiments involving i.v. injections of Kallikrein demonstrated that the method used in detecting release of kinins in circulating blood was reliable. No significant differences in the kininogen content of plasma were noted at various intervals following onset of shock. Perhaps we could not confirm the finding of increased circulating polypeptide-like substances as reported by KOBOLD et al.²²⁻²⁴ because of differences in the specificity

¹ Supported in part by a grant of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CNICT), Argentina.

² M. SCHACHTER, Fedn. Proc. 27, 49 (1968).

³ M. ROCHA E SILVA, W. T. BERALDO and G. ROSENFIELD, Am. J. Physiol. 156, 261 (1949).

⁴ D. J. HOLDSTOCK, A. P. MATHIAS and M. SCHACHTER, Br. J. Pharmacol. 12, 149 (1957).

⁵ D. ARMSTRONG, J. B. JEPSON, C. A. KEELE and J. W. STEWART, J. Physiol. Lond. 135, 350 (1957).

⁶ R. C. GRAHAM JR., R. H. EBERT, O. D. RATNOFF and J. M. MOSES, J. exp. Med. 121, 807 (1965).

⁷ R. W. KELLERMAYER and C. GRAHAM JR., New Engl. J. Med. 279, 754, 802, 859 (1968).

⁸ S. M. HILTON and G. P. LEWIS, J. Physiol. Lond. 128, 235 (1955).

⁹ G. P. LEWIS, Gastroenterology 52, 406 (1967).

¹⁰ M. ROCHA E SILVA and A. ANTONIO, Medna. exp. 3, 371 (1960).

¹¹ O. A. CARRETERO, A. NASJLETTI and J. C. FASCILO, Experientia 21, 141 (1965).

¹² M. J. ALLWOOD and G. P. LEWIS, J. Physiol. Lond. 170, 571 (1964).

¹³ A. P. THAL, E. E. KOBOLD and M. J. HOLLENBERG, Am. J. Surg. 105, 708 (1963).

¹⁴ J. A. OATES, K. MELMON, A. SJOERDSMA, L. GILLESPIE and D. T. MASON, Lancet 7, 514 (1964).

¹⁵ W. T. BERALDO, Am. J. Physiol. 163, 283 (1950).

¹⁶ M. E. WEBSTER and W. R. CLARK, Am. J. Physiol. 197, 406 (1959).

¹⁷ A. S. NIES, R. P. FORSYTH, H. E. WILLIAMS and K. L. MELMON, Circulation Res. 22, 155 (1968).

¹⁸ E. G. ERDOS and I. MIWA, Fedn. Proc. 27, 49 (1968).

¹⁹ Bacterial lipopolysaccharide B prepared from *Salmonella typhosa* (Difco Laboratories, Mich., USA).

²⁰ J. C. FASCILO, J. ESPADA and O. A. CARRETERO, Acta physiol. latinam. 13, 215 (1963).

²¹ A. BINIA, J. C. FASCILO and O. A. CARRETERO, Acta physiol. latinam. 13, 101 (1963).

²² E. E. KOBOLD, R. LUCAS and A. P. THAL, Chemical mediators in clinical septic shock, Clinical Congress 1963 (American College of Surgeons, Chicago 1963), 13, p. 16.

²³ E. E. KOBOLD, R. PREUTT and A. P. THAL, Clin. Res. 10, 289 (1962).

²⁴ E. E. KOBOLD, R. LOVELL, W. KATZ and A. P. THAL, Surg. Gyn. Obst. 118, 807 (1964).

of the methods employed. Therefore, we may conclude that if kinins are released during endotoxin shock in dogs, the concentration does not seem sufficiently large to ascribe a physiologic role to them. Following similar hypotensive episodes produced by Kallikrein injection, we detected considerable amounts of kinins. Our study showed no significant participation of the plasma kinins in endotoxic shock in the dog.

Résumé. Aucune quantité détectable de kinines ne fut trouvée après administration d'endotoxine et l'on n'obtint pas de différence significative dans le contenu plasmatique en kininogènes après l'injection. Nos résul-

tats n'attribuent aux kinines aucune participation significative à l'hypotension du choc endotoxique.

O. A. CARRETERO²⁵, A. NASJLETTI
and J. C. FASCILO

*Department of Physiology,
Facultad de Ciencias Médicas,
Universidad Nacional de Cuyo,
Mendoza (Argentina), 14 August 1969.*

²⁵ Present address: Hypertension Research Laboratory, Henry Ford Hospital, Detroit (Mich., USA).

Fehlerkorrekturen bei stereologischen Messungen an menschlichen Plazenten: 3. Der Holmes-Effekt

Wenn an Paraffinschnitten von menschlichen Plazenten Zottenvolumen und -oberfläche mit Hilfe des Integrationsokulares bestimmt werden sollen, so muss ausser der Schrumpfung und der Schnittstauchung¹ auch eine weitere Fehlerquelle berücksichtigt werden: Im Gegensatz zu Anschliffen in der Petrographie kann bei dickeren histologischen Schnitten das Messergebnis zu hoch sein, da auch nicht direkt in der optischen Ebene gelegene Teile mitgemessen werden. Diese Erscheinung wird als Holmes-Effekt bezeichnet². Für kugelige Objekte sind Korrekturfaktoren bekannt, die es erlauben, den Einfluss des Holmes-Effektes auszuschalten^{2,3}. Die Plazentarzotten jedoch sind eher aus zylindrischen Abschnitten aufgebaut. Es galt daher festzustellen, inwiefern im Falle der menschlichen Plazenta das Messresultat bei verschiedener Schnittdicke durch den Holmes-Effekt beeinflusst wird.

Material und Methode. Als Untersuchungsmaterial dienten die bei der Untersuchung der Schnittstauchung bereits beschriebenen Paraffinschnitte menschlicher Plazenten¹. Die Messung von Zottenvolumen und -oberfläche erfolgte bei einer Vergrößerung von 320 $\times$ mit Hilfe des Integrationsokulares nach MERZ⁴. Für jede Schnittdicke wurden 30 Bildfelder aus dem gleichen Schnitt vermessen, und zwar in drei voneinander unabhängigen Serien und in unregelmässiger Reihenfolge der Schnittstücken. Die Erfahrung hatte gezeigt, dass bei dieser Aufgliederung der durch den Messenden verursachte systematische Fehler am kleinsten gehalten werden kann.

Ergebnisse und Diskussion. Es wäre zu erwarten, dass infolge des Holmes-Effektes die gemessenen Werte von Zottenvolumen und -oberfläche bei den dicken Schnitten höher liegen würden. Dies ist aber nach dem Ergebnis unserer Messungen nicht der Fall (Figuren 1 und 2). Für die Oberflächenmessung scheinen sogar die Werte für die dickeren Schnitte bedeutend niedriger zu liegen als für die dünnen Schnitte. Nach der in diesem Fall jedoch unerlässlichen Korrektur des Einflusses der Schnittstauchung¹ ergibt sich sowohl für das Zottenvolumen als auch für die Zottenoberfläche eine Regressionsgerade, die nur um einen geringen, statistisch nicht signifikanten, Betrag von der Horizontalen abweicht.

Die Erklärung für das Fehlen eines Anstieges der Werte in Richtung der dickeren Schnitte ist darin zu suchen, dass es bei zunehmender Schnittdicke vermehrt zu Überlagerungen von Zottenanschnitten kommt, die das Erfassen des Gesamtvolumens und der Gesamtoberfläche erschweren. Bei der Volumenmessung beispielsweise

wurden pro Bildfeld durchschnittlich 20 Trefferpunkte gezählt. Wenn nun in jedem Bildfeld durch Überlagerung von Zottenanschnitten 2 Trefferpunkte der Zählung entgehen, so entspricht dies einem Verlust von 10%. Ein

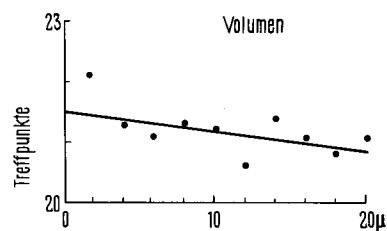


Fig. 1. Einfluss der Schnittdicke auf die Messung des Zottenvolumens. Die anhand der gezählten Trefferpunkte berechnete Regressionsgerade des Volumens zeigt keinen Anstieg in Richtung der dickeren Schnitte (Regressionskoeffizient $b = -0,036$).

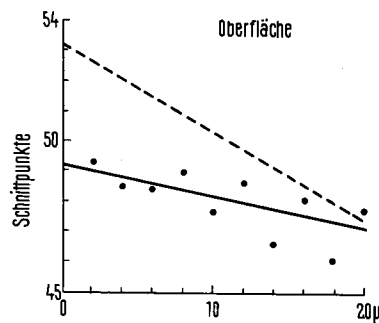


Fig. 2. Einfluss der Schnittdicke auf die Messung der Zottenoberfläche. Die berechnete Regressionsgerade zeigt keinen Anstieg in Richtung der dickeren Schnitte (Regressionskoeffizient $b = -0,11$, ohne Stauchungskorrektur sogar $b = -0,28$, siehe gestrichelte Gerade).

¹ R. BAUR, *Experientia* 25, 1172 (1969); 25, 1173 (1969).

² E. R. WEIBEL und H. ELIAS, *Quantitative Methods in Morphology* (Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1967), p. 97.

³ A. HENNIG, *Z. mikr.-anat. Forsch.* 66, 513 (1960). – *Mikroskopie* 12, 7 und 174 (1957).

⁴ W. A. MERZ, *Mikroskopie* 22, 132 (1967).