

in higher body levels of amphetamine but also increased the biological half-life of the drug (Figure 3). Since pretreatment with iprindole resulted in both a sustained increase in the concentration of D-amphetamine in brain as well as in a marked increase in the body levels of D-amphetamine, it may be concluded that iprindole, like

DMI and other tricyclic antidepressants, inhibits the metabolism of D-amphetamine in vivo. Since iprindole does not block the uptake of norepinephrine¹⁵, the results of the present studies indicate that the potentiation of amphetamine by iprindole is a consequence of this metabolic interaction. Moreover, the results of the present studies further emphasize the importance of metabolic considerations in the proper interpretation of drug interaction studies¹⁷.

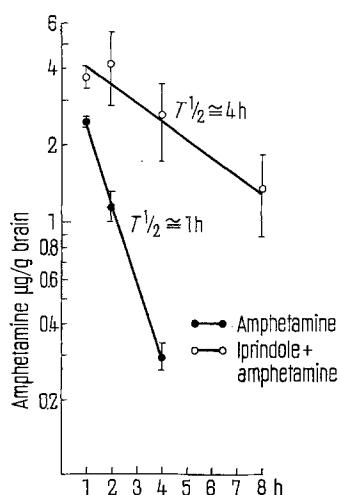


Fig. 2. Effect of iprindole on brain levels of D-amphetamine. Iprindole (10 mg/kg) was given i.p. 30 min before the administration of D-amphetamine (3 mg/kg per i.p.). Each point represents the mean value of 4 animals. Vertical bars indicate the standard deviation of the mean.

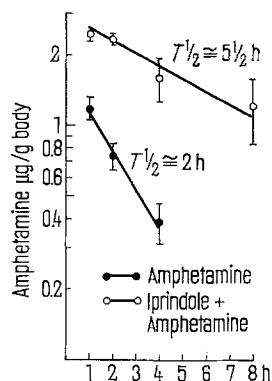


Fig. 3. Effect of iprindole on body levels of D-amphetamine. For details, see legend Figure 2.

- 1 A. WEISSMAN, B. K. KOE and S. S. TENEN, *J. Pharmac. exp. Ther.* **151**, 339 (1966).
- 2 L. C. F. HANSON, *Psychopharmacologia* **10**, 289 (1967).
- 3 J. V. DINGELL, M. L. OWENS, M. R. NORVICH and F. SULSER, *Life Sci.* **6**, 1155 (1967).
- 4 J. GLOWINSKI and J. AXELROD, *Nature* **204**, 1318 (1964).
- 5 A. CARLSSON, K. FUXE, B. HAMBERGER and M. LINDQUIST, *Acta physiol. scand.* **67**, 481 (1966).
- 6 P. L. CARLTON, *Psychopharmacologia* **2**, 364 (1961).
- 7 L. STEIN and T. SEIFTER, *Science* **134**, 286 (1961).
- 8 C. L. SCHECKEL and E. BOFF, *Psychopharmacologia* **5**, 198 (1964).
- 9 F. SULSER, M. H. BICKEL and B. B. BRODIE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **144**, 321 (1964).
- 10 F. SULSER, M. L. OWENS and J. V. DINGELL, *Life Sci.* **5**, 2005 (1966).
- 11 L. VALZELLI, S. CONSOLI and C. MORPURGO, *Symposium on Antidepressant Drugs* (Excerpta Medica Foundation, Amsterdam 1967), p. 61.
- 12 S. CONSOLI, E. DOLFINI, S. GARATTINI and L. VALZELLI, *J. Pharmac. Pharmac.* **19**, 253 (1967).
- 13 J. V. DINGELL and A. D. BASS, *Biochem. Pharmac.* **18**, 1535 (1969).
- 14 T. LEWANDER, *Europ. J. Pharmac.* **6**, 38 (1969).
- 15 M. I. GLUCKMAN and T. BANN, *Psychopharmacologia* **15**, 169 (1969).
- 16 J. AXELROD, *J. Pharmac. exp. Therap.* **110**, 315 (1954).
- 17 The present studies were supported by USPHS Grants No. MH-11468, GM-15431 and MH-08107. The authors are indebted to Mrs. M. L. OWENS for her valuable technical assistance.

Die Wirkung von Theophyllin auf den cellulären Ca-Stoffwechsel des Warmblüterherzens¹

Die positiv inotrope Wirkung von Theophyllin wird wie die von Adrenalin an isolierten Meerschweinchenvorhöfen durch Vorgabe von zweiwertigen Mangan-Ionen abgeschwächt². Da Mn^{++} den an verschiedenen Herzpräparaten während der Erregung messbaren³⁻⁵ Ca-Einstrom unterdrückt⁶, wurde aus diesen Befunden geschlossen, dass die kontraktionskraftsteigernde Wirkung von Theophyllin zumindest teilweise über einen erhöhten Einstrom von extrazellulärem Ca während des Erregungsprozesses zustande kommt. Um diese Hypothese weiter zu prüfen wurde an isolierten Präparaten aus

Warmblüterherzen 1. der Einfluss von Theophyllin auf den zellulären ^{45}Ca -Umsatz sowie 2. auf Kontraktionskraft und gleichzeitig auf Ca-abhängige Membranpotentialänderungen untersucht, denen, wie in vorangehenden Untersuchungen^{7,8} gezeigt wurde, wahrscheinlich ein Ca-Einstrom in die Myokardzelle zugrunde liegt.

Methode. 1. Isolierte linke Meerschweinchenvorhöfe (mit 170 Imp/min gereizt oder ruhend) wurden 60 min lang in Tyrodelösung mit 0,45 mM $CaCl_2$ äquilibriert und anschliessend für 2-60 min in ^{45}Ca -haltiger Tyrodelösung ($[Ca]_0$ 0,45 mM) ohne und mit 5×10^{-4} g/ml Theophyllin

aufgeladen. In dieser Konzentration bewirkte Theophyllin unter den gewählten Bedingungen eine Zunahme der Kontraktionskraft um maximal 500% und führte zu keiner Zeit zu Arrhythmien oder Kontrakturen. Am Ende der verschiedenen langen Aufladezeiten wurde in den Präparaten die Ca-Konzentration und die ^{45}Ca -Aktivität bestimmt und die spezifische Aktivität im Gewebe (Ipm/0,1 μAq Ca) sowie nach Abzug des extrazellulären Ca- und Aktivitätsanteiles der Markierungsgrad des intrazellulären Ca (spezifische Aktivität intrazellulär $\times 100$ /spezifische Aktivität extrazellulär = relative spezifische Aktivität) errechnet. Der Extrazellulärraum wurde als Inulinraum gemessen. Er war ohne und mit Theophyllin nicht verschieden und betrug 30,4 bzw. 32,1 ml/100 g Feuchtgewicht. – Zur Bestimmung der ^{45}Ca -Abgabe wurden die Meerschweinchenvorhöfe 60 min lang in ^{45}Ca -haltiger Tyrodelösung mit 0,45 mM CaCl₂ ohne Theo-

phyllin schlagend aufgeladen und anschliessend für verschiedene Zeiten in inaktiver Tyrodelösung ([Ca]₀ 0,45 mM) mit und ohne 5×10^{-4} g/ml Theophyllin ruhend oder schlagend entladen. – 2. Isolierte dünne Trabekel aus Schafs- und Kalbsherzen wurden in Tyrodelösung + 10^{-5} g/ml Tetrodotoxin (zur Ausschaltung des Na-Einstromes⁸) mit Hilfe einer Saccharosebrücke stufenweise depolarisiert^{7,8}; Membranpotential und Kontraktion wurden vor und nach Gabe von Theophyllin (10^{-4} bis 10^{-3} g/ml) gleichzeitig registriert. Unter diesen Bedingungen kommt es ab -55 bis -45 mV zu einer schnellen Depolarisation, der die Auslösung der Kontraktion parallel geht. Amplitude (mV) und Anstiegssteilheit (V/sec) der schnellen Depolarisationsstufe können als indirektes Mass für die Grösse des während der Depolarisation fließenden Ca-Einwärtsstromes angesehen werden^{7,8}.

Ergebnisse. Bei elektrisch gereizten Meerschweinchenvorhöfen war der Ca-Gehalt bei den Kontrollen und unter dem Einfluss von Theophyllin nicht signifikant verschieden. Er betrug, für die gesamte Versuchsdauer zusammengefasst, ohne und mit Theophyllin $0,21 \pm 0,01$ ($n = 141$) bzw. $0,22 \pm 0,01$ ($n = 127$) $\mu\text{Aq}/100$ mg Feuchtgewicht. Die ^{45}Ca -Aufnahme erreichte in diesen Versuchen nach 30–60 min ein Gleichgewicht. Theophyllin steigerte die ^{45}Ca -Aufnahme bis zur 10. min signifikant (Figur 1). Die

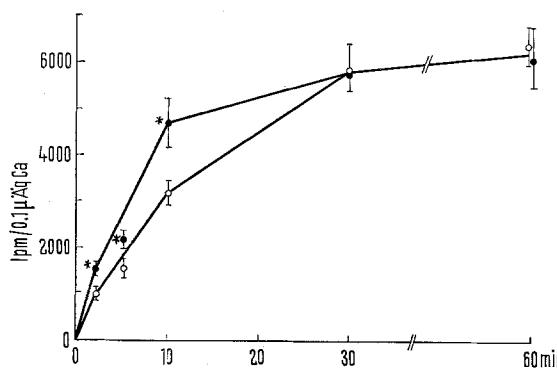


Fig. 1. ^{45}Ca -Aufnahme in elektrisch gereizte linke Meerschweinchenvorhöfe bezogen auf den Ca-Gehalt des Gewebes (Ipm/0,1 μAq Ca = spezifische Aktivität; Ordinate) in Abhängigkeit von der Aufladezeit (Abszisse) ohne (○—○) und mit (●—●) $5 \cdot 10^{-4}$ g/ml Theophyllin. Dargestellt sind Mittelwerte mit deren mittleren Fehlern bei 19–43 Präparaten. * bezeichnet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) gegenüber den Kontrollen.

¹ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

² T. MEINERTZ und H. SCHOLZ, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 265, 131 (1969).

³ H. REUTER, J. Physiol. 192, 479 (1967).

⁴ O. ROUGIER, G. VASSORT, D. GARNIER, Y.-M. GARGOUIL und E. CORABOEUF, Pflügers Arch. ges. Physiol. 308, 91 (1969).

⁵ H. REUTER und G. W. BEELER, Science 163, 399 (1969).

⁶ O. ROUGIER, G. VASSORT, D. GARNIER, Y.-M. GARGOUIL und E. CORABOEUF, C. r. Acad. Sci., Paris 266, 802 (1968).

⁷ H. REUTER und H. SCHOLZ, Pflügers Arch. ges. Physiol. 300, 87 (1968).

⁸ H. SCHOLZ, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 265, 187 (1969).

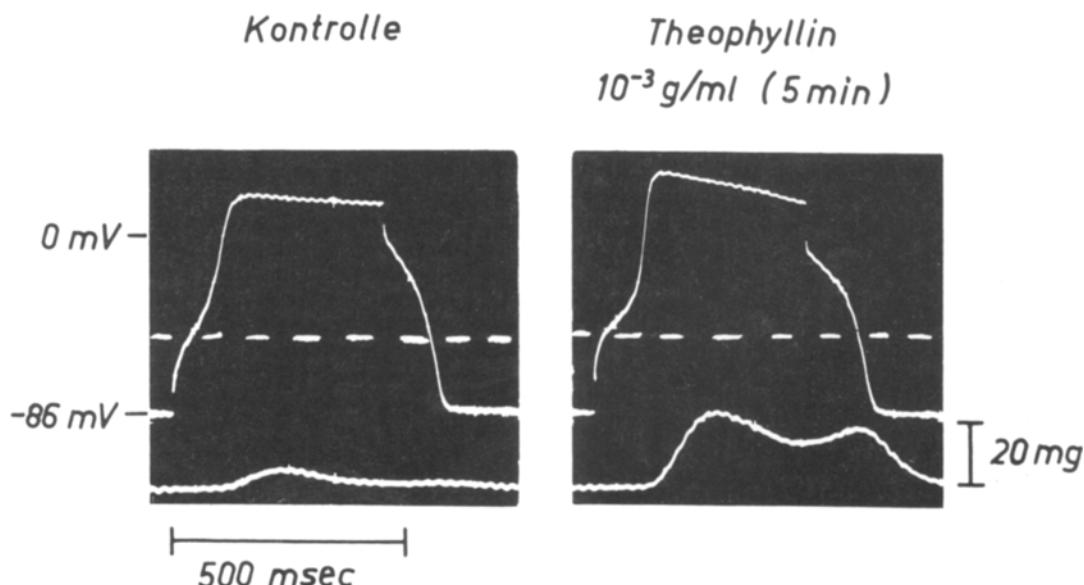


Fig. 2. Gleichzeitige Registrierung einer zweistufigen Depolarisation (oberer Strahl) und zugehöriger Kontraktion (unterer Strahl) vor und 5 min nach Zugabe von 10^{-3} g/ml Theophyllin, jeweils gemessen im Kontraktionsgleichgewicht. Reizdauer 500 msec. Kalbstrabekel. Tyrodelösung mit 0,45 mM Ca und 10^{-5} g/ml Tetrodotoxin. Ruhepotential -86 mV. Die gestrichelten Linien markieren den Beginn der schnellen Depolarisationsphase (-46 mV).

relative spezifische Aktivität nahm unter Theophyllineinwirkung in den ersten 10 min bis etwa zum 3fachen der Kontrollwerte zu. Die endgültige Markierung des intrazellulären Ca (Werte nach 30 und 60 min) wurde durch Theophyllin jedoch nicht beeinflusst. – Die ^{45}Ca -Abgabe wurde durch Theophyllin gegenüber den Kontrollen ebenfalls beschleunigt. – An ruhenden Vorhöfen beeinflusste Theophyllin die ^{45}Ca -Aufnahme und -Abgabe nicht.

Amplitude und Anstiegssteilheit der schnellen Depolarisationsstufe wurden durch Theophyllin verstärkt (Figur 2). Bei dem abgebildeten Versuch hat die Anstiegssteilheit 5 min nach Zugabe von 10^{-3} g/ml Theophyllin von 1,05 auf 2,22 V/sec und die Amplitude von 65 auf 75 mV zugenommen. Gleichzeitig kam es nach Theophyllin zu einer Zunahme der Kontraktionskraft. Die Veränderungen der schnellen Depolarisationsstufe und der Kontraktion nach Theophyllinzugabe bildeten sich mit der gleichen Geschwindigkeit aus. Beide Messgrößen wurden auch bei Änderung der Theophyllinkonzentration im Bereich zwischen 10^{-4} und 10^{-3} g/ml gleichsinnig verändert. Die Schwelle für die schnelle Depolarisationsphase und für die Kontraktion (Figur 2, gestrichelte Linie) sowie das Ruhepotential wurden durch Theophyllin nicht beeinflusst.

Diskussion. Die Wirkung von Theophyllin auf den ^{45}Ca -Umsatz besteht in einer Beschleunigung der ^{45}Ca -Aufnahme und -Abgabe bei unveränderter Markierbarkeit des zellulären Ca. Die elektrophysiologischen Versuche ergaben eine gleichsinnige und gleichzeitige Beeinflussung von elektrischen und mechanischen Messgrößen durch Theophyllin. Insgesamt gesehen ist es nach diesen Befunden wahrscheinlich, dass Theophyllin die Membranpermeabilität für Ca-Ionen während der Erregung steigert. Dadurch könnte es unter dem Einfluss von Theophyllin während des Aktionspotentials zu einem gesteigerten Einstrom von Ca-Ionen aus dem Extrazellulärtraum und damit vorübergehend zu einer Zunahme der intrazellulären Konzentration an freien Ca^{++} kommen, die die Zunahme der Kontraktionskraft bewirken würde. Hinweise dafür, dass Theophyllin in ausschließlich positiv inotrop und nicht toxisch wirkenden Kon-

zentrationen etwa wie Herzglykoside die austauschbare Ca-Fraktion erhöhen^{9,10}, zum Beispiel durch einen Einfluss auf das sarkoplasmatische Retikulum und andere intrazelluläre Bindungsstellen¹¹, wurden nicht beobachtet. Vielmehr scheint die Wirkung von Theophyllin am Warmblüterherzen qualitativ derjenigen von Adrenalin zu entsprechen, das ebenfalls den ^{45}Ca -Umsatz bei Meerschweinchenvorhöfen beschleunigt¹² und den elektrophysiologisch messbaren Ca-Einstrom während der Erregung an verschiedenen Herzpräparaten steigert^{3,13-15}.

Summary. In isolated, electrically driven, left guinea-pig atria, theophylline (5×10^{-4} g/ml) increased the rate of ^{45}Ca uptake and release without affecting the total myocardial Ca content and the amount of exchangeable cellular Ca. In sheep and calf heart preparations, theophylline (10^{-4} - 10^{-3} g/ml) increased Ca inward current during excitation (as examined indirectly by Ca dependent changes of membrane potential in TTX-containing solutions) as well as tension development. It is concluded that the positive inotropic effect of theophylline in mammalian hearts is due to an increase in Ca influx during the excitation process.

H. SCHOLZ

*Pharmakologisches Institut der Universität,
D-65 Mainz (Deutschland), 9. Februar 1970.*

⁹ W. KLAUS und G. KUSCHINSKY, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 244, 237 (1962).

¹⁰ H. LÜLLMANN und W. HOLLAND, J. Pharmac. exp. Ther. 137, 186 (1962).

¹¹ W. KLAUS und K. S. LEE, J. Pharmac. exp. Ther. 166, 68 (1969).

¹² H. REUTER, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 251, 401 (1965).

¹³ H. REUTER, Pflügers Arch. ges. Physiol. 287, 357 (1966).

¹⁴ G. VASSORT, O. ROUGIER, D. GARNIER, M. P. SAUVIAT, E. CORABOEUF und Y.-M. GARGOUIL, Pflügers Arch. ges. Physiol. 309, 70 (1969).

¹⁵ H. SCHOLZ und H. REUTER, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 260, 196 (1968).

Occurrence of Phyllomedusin, a Physalaemin-Like Decapeptide, in the Skin of *Phyllomedusa bicolor*¹

Methanol extracts of the skin of the South American amphibian *Phyllomedusa bicolor* contain a decapeptide possessing a biological activity very similar to that of physalaemin and eledoisin and a structure closely related to both of them. The isolation and the elucidation of the structure of this peptide are briefly reported.

Eight specimens of *Phyllomedusa bicolor*, captured near Obidos, Pará, Brazil (January 1967), yielded 92 g of fresh skin, which was immediately extracted with methanol. The extract corresponding to 60 g of fresh skin was evaporated to dryness and the residue dissolved in 95% ethanol. The liquid was passed through a column of alkaline alumina which was then eluted with ethanol-water mixtures of decreasing ethanol concentrations. The physalaemin-like activity appeared in the 80% ethanol eluate and the active fraction was found to be almost free of contaminants by chromatographic and electrophoretic criteria. On high voltage electrophoresis on paper, the active spot was found to possess about the same mobility as physalaemin and eledoisin in acidic media ($E_{1,2} = 0.45$ Glu) but, unlike the above peptides, showed a moderately

basic character at neutral pH ($E_{5,8} = 0.3$ His). The spot was positive to chlorine but could not be revealed either by ninhydrin, denoting the absence of lysine and of a free terminal amino group, or by the α -nitroso- β -naphthol and Pauly reagents, denoting the absence of tyrosine. Instead, it was positive to the Sakaguchi reagent for arginine.

On total acid hydrolysis, the spot eluted from the electropherograms yielded 1 mole of methionine, leucine, glycine, isoleucine, phenylalanine, arginine, proline and glutamic acid and 2 moles of aspartic acid. Since the amino acid pattern of the 80% ethanol eluate from the alumina column was essentially the same, a further purification was thought to be unnecessary and the eluate was used for the sequential analysis. This consisted, as in the

¹ Supported in part by grants from the Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.