

may be increased by this treatment¹² it is likely that increased adrenal catecholamine release in the 6-OH DA treated animals coupled with increased sensitivity to circulating norepinephrine accounts for the maintenance of arterial pressure at levels which are only slightly below normal. In contrast to the enhanced sensitivity to norepinephrine, the response to tyramine was markedly diminished in sympathectomized animals in agreement with prior studies^{4,5} and illustrates the dependence of the tyramine response upon intact adrenergic innervation.

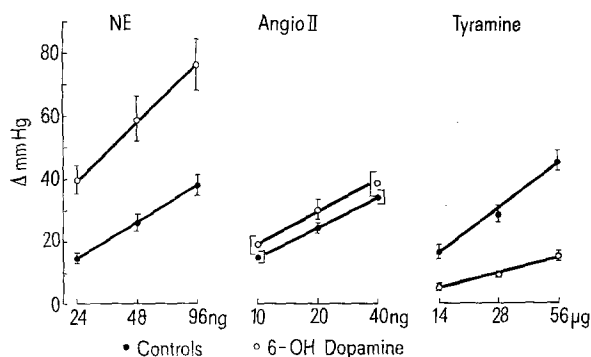
There was no demonstrable alteration in the arterial pressure response to angiotensin II following chemical sympathectomy. Release of adrenal catecholamines by angiotensin II has been demonstrated during intravenous infusion of the peptide and in the isolated perfused adrenal gland¹³. If adrenal catecholamine release were a significant part of the pressor effect of angiotensin II it might be expected that increased pressor responses to this peptide would be observed in the chemically sympathectomized rat in view of the increased response to infused norepinephrine. Alternatively, if a significant portion of the pressor action of angiotensin II required intact sympathetic innervation via release of norepine-

phrine from nerve endings¹⁴, chemical sympathectomy should be associated with reduced pressor responses to angiotensin II, similar to those observed with tyramine. The nearly identical pressor responses to angiotensin II, observed in control and 6-OH DA treated rats strongly suggests that the direct vasopressor action of angiotensin is unchanged by chemical sympathectomy, and that an indirect effect upon the peripheral sympathetic nervous system is of little consequence to the acute action of the peptide when nerve impulses are eliminated. This is in agreement with prior studies utilizing receptor blocking agent¹⁵ or reserpine¹⁶. A possible central action of angiotensin II requiring ganglionic transmission¹⁷ or an action dependent upon sympathetic nerve stimulation^{18,19} could not be evaluated in this study.

Résumé. L'action de la dopamine 6-OH (6-OH DA) sur les réponses de la tension artérielle à la norépinéphrine, la tyramine, et l'angiotensine II a été étudiée chez le rat. 24 h après l'injection i.v. de 6-OH DA (100 mg/kg), la différence de tension due à la norépinéphrine fut nettement plus marquée alors que celle à la tyramine avait presque disparu. L'ablation chimique du système sympathique n'a aucun effet sur la réponse de la tension à l'angiotensine II.

L. R. KRAKOFF²⁰ and S. M. GINSBURG

Laboratory of Circulatory Physiology, Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, of The City University of New York, Fifth Avenue and 100th Street, New York (New York 10029, USA) 15 February 1973.



The rise in arterial pressure produced by 3 levels of norepinephrine (NE), angiotensin II (angio II) and tyramine are shown for control and 6-OH DA treated rats. Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. The difference between control and 6-OH DA treated groups was significant ($P < 0.005$) at all dose levels for norepinephrine and tyramine. For angiotensin II, there was no significant difference ($p > 0.1$) at any dose level.

¹² R. A. MUELLER, H. THOENEN and J. AXELROD, *Science* 163, 468 (1969).

¹³ M. J. PEACH, *Circulation Res. Suppl.* II, 28, 29, 107 (1971).

¹⁴ A. DISTLER, H. LIEBAU and H. P. WOLFF, *Nature* 207, 764 (1965).

¹⁵ P. A. KHAIRALLAH, I. H. PAGE, F. M. BUMPUS and R. F. TURKER, *Circulation Res.* 19, 247 (1966).

¹⁶ R. K. TURKER and E. KARAHUSEYINOGLU, *Experientia* 24, 921 (1968).

¹⁷ W. B. SEVERS, A. E. DANIELS, H. H. SMOOKLER, W. J. KINNARD and J. P. BUCKLEY, *153*, 530 (1969).

¹⁸ B. G. ZIMMERMAN and J. GISSLEN, *163*, 320 (1968).

¹⁹ C. BELL, *Circulation Res.* 31, 348 (1972).

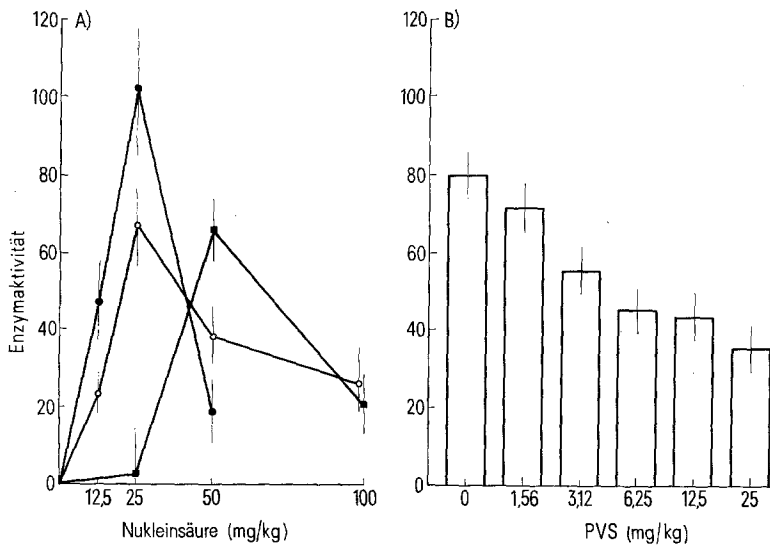
²⁰ Dr. L. R. KRAKOFF is the recipient of a National Heart and Lung Institute Career Development Award No. 5 KO4 HL 46495.

Desoxyribonuclease I in Mäusenieren nach Ganzkörper-Röntgenbestrahlung oder Gabe von 2, 4, 6-Triäthylenimino-s-triazin unter dem Einfluss von Polyanionen

Biochemische Reaktionen mit unmittelbarem Bezug auf Nukleinsäuren lassen sich in vitro durch Polyanionen beeinflussen^{1,2}, wobei Hemm- und/oder Aktivierungseffekte auftreten können. Ersteren unterliegen RNA-Polymerase, Ribosomenfunktion und zellfreie Protein-synthese¹⁻⁶, letzteren die DNA-Synthese⁷⁻⁹, beiden u.a. der Abbau von DNA an Pankreas-DNase¹⁰.

In vivo-Wirkungen von Polyanionen sind nicht zuletzt im Hinblick auf ihre gelegentlich beobachtete antimetabolische Wirkung^{11,12} von besonderem Interesse. Vorliegend wurde der Einfluss von Polyanionen (Polyvinylsulfat, Pentosanpolysulfat und heterologen Nukleinsäuren) auf die Induktion einer neutralen Desoxyribonuclease (DNase I, E.C. 3.1.4.5) in Mäusenieren nach Ganzkörper-Röntgenbestrahlung (GKB) oder Gabe von 2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin (TEM)¹³ untersucht.

Methodik. Für die Untersuchungen standen ca. 300 weibliche Mäuse (K.-Gew. 19–23 g) aus institutseigener, konventioneller Zucht zur Verfügung. Die Tiere wurden bei 22–24°C in Versuchsgruppen von 4–6 gehalten und erhielten Futter (Altromin®) und Wasser ad libitum. Gruppen von jeweils 4–6 Tieren wurden zu Versuchsbeginn entweder röntgenbestrahlt (Kristalloflex 4 der Fa. Siemens und Halske, Röhrenspannung 60 kV, Stromstärke 30 mA, HWS 0,16 mm Cu, Filterung mit 0,16 mm Cu, Focus-Objekt-Abstand 24 cm, Oberflächendosisleistung 70 R/min, Oberflächendosis 420 R, entsprechend ca. 170 rad) oder erhielten TEM (Lederle Laboratories Division, American Cyanamid Company, Pearl River, New York) i.v.. Den Testgruppen wurden unmittelbar anschliessend sowie 24 und 48 h später Polyvinylsulfat (PVS, K-salz, rein, Serva Nr. 33426), Pentosanpolysulfat (SP₅₄®, Na-salz,



DNase I-Aktivität in Nierenhomogenaten von Mäusen 3 Tage nach GKB unter dem Einfluss von Polyanionen. ●, DNA-I; ○, DNA-II; ■, RNA. Säulendiagramm: PVS. Ordinate: A) Veränderungen der Enzymaktivität (%), bezogen auf den Vergleichswert der bestrahlten Kontrollmäuse. B) Veränderungen (%), bezogen auf die Vergleichsnorm (Mäuse nach Scheinbestrahlung). Abszisse: A) Nukleinsäuredosis (mg/kg K.-Gew.) B) PVS-Dosis (mg/kg K.-Gew.).

Benechemie, München-Solln), DNA-I (Na-salz aus Kalbsthymus, hochmolekular, mind. 95% DNA, Mol.-Gew. 8900000, Ega-Chemie Keppler und Reif, Steinheim am Albuch), DNA-II (Na-salz, niedermolekular, aus Heringsamen, Schuchardt Nr. DE 054) oder RNA (Na-salz, Schuchardt Nr. RI 083) in Dosen von 1,56–100 mg/kg K.-Gew. i.v. injiziert. Die Kontrollgruppen erhielten anstelle von Polyanionen physiol. Kochsalzlösung i.v.. 72 h nach Versuchsbeginn wurden alle Tiere erneut gewogen und in leichter Chloroformnarkose entblutet. Unter Bezug auf die Gewichtseinheit Protein wurde die in vitro-Aktivität der DNase I anschliessend in Serum und Nierenhomogenat gemessen¹³.

Ergebnisse. 1. 2–3 Tage nach GKB oder i.v. Injektion von TEM vergrößert sich die DNase I-Aktivität in Nierenhomogenaten von Ratten¹⁴ und Mäusen¹³ signifikant in allen Bezugssystemen dosis- und zeitabhängig um das Zwei- bis Dreifache der Norm. Als Mechanismus der Reaktion wurde Enzyminduktion angenommen, da der Aktivitätszuwachs der DNase I durch Hemmstoffe der Proteinsynthese unterdrückt werden kann^{13, 14}.

2. Hinsichtlich des Einflusses von Polyanionen zeigten sich wesentliche Unterschiede zwischen Nukleinsäuren und Heparinoiden (Figur): Durch DNA oder RNA wurde der Aktivitätsanstieg der DNase I in Nierenhomogenaten von Mäusen nach GKB um maximal 50–100% verstärkt. Bei Nukleinsäure-Dosen von ≥ 25 bzw. 50 mg/kg verhielt sich der Effekt rückläufig. Die DNase I-Reaktion der

Niere auf GKB wurde demgegenüber durch PVS (1,56–25,0 mg/kg) oder SP₅₄[®] ($> 12,5$ mg/kg) dosisabhängig und nicht-kompetitiv um maximal 60% gehemmt. In kleineren Dosen (6,25 und 12,5 mg/kg) vergrößerte SP₅₄ die Enzymaktivität um durchschnittlich 30%. Zu prinzipiell ähnlichen Ergebnissen führte die Kombination von TEM mit den genannten Polyanionen.

3. Die gleichzeitige Gabe von DNA und PVS ergab Wirkungssummutation. Der aktivierende Einfluss von Nukleinsäuren war durch Actinomycin D (0,1–0,3 mg/kg) dosisabhängig zu unterdrücken.

4. Im Hinblick auf mögliche Beziehungen zwischen den DNase I-Aktivitäten von Serum und Niere fallen a) die häufigkeitsstatistisch ($\chi^2 = 5,3$, $p < 0,05$) zu sichernde Gegenläufigkeit der Aktivitätsänderungen (123 von 158 Stichproben) in Serum und Niere, b) das Ausbleiben einer statistisch gesicherten quantitativen Korrelation und c) das zeitliche Voraus des Aktivitätsabfalles im Serum (Tabelle) auf.

5. Durch insgesamt 3 im Abstand von 24 h wiederholte i.v. Injektionen von DNA (hochmolekular, 6,25, 12,5, 25,0 bzw. 50,0 mg/kg) oder PVS (3,12, 6,25, 12,5 bzw. 25,0 mg/kg) wurde die 72 h nach der ersten Nukleinsäure-Injektion gemessene DNase I-Aktivität in Nierenhomogenaten von im übrigen unbehandelten Mäusen um

DNase I-Aktivität in Nierenhomogenaten von Mäusen ($n = 5$ je Messwert) 1–6 Tage nach GKB (420 R) oder i.v. Injektion von TEM (2,0 mg/kg)

	GKB				TEM			
Tag p. irr.	1	2	3	6	1	2	3	6
Niere	± 0	+200	+142	+128	+29	+68	+236	+39
Serum	-38	-21	-26	-34	-58	-66	-46	-27

Prozentuale Veränderungen gegenüber den Kontrollen. Durchschnittliche Var.-Koeffizienten 20,5% (Niere) bzw. 28,7% (Serum). Unter den Bedingungen des Kontrollansatzes¹³ wurden von Nierenhomogenat 78 ± 12 und von Serum $1,4 \pm 0,26 \mu\text{g DNA-p/min/1,0 g Protein freigesetzt}$.

¹ A. WACKER, M. ISHIMOTO und P. CHANDRA, Z. Naturf. 22b, 413 (1967).

² A. WACKER, P. CHANDRA, I. HAENZEL und D. GERIKE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 351, 1273 (1970).

³ P. CHAMON, M. RAMUZ, P. MANDEL und J. DOLY, Biochim. biophys. Acta 149, 584 (1967).

⁴ T. SHINOZAWA, I. YAHARA und I. KAZUTOMO, J. molec. Biol. 36, 305 (1968).

⁵ V. NEUHOFF, W.-B. SCHILL und H. STERNBACH, Biochem. J. 177, 623 (1970).

⁶ Y. AOKI und H. KISHIHARA, Biochim. biophys. Acta 272, 33 (1972).

⁷ M. SKALA, J. MATYÁSOVÁ und M. CEJKOVÁ, Folia biol. (Praha) 14, 466 (1968).

⁸ L. BENES und V. ROTREKLOVA, Folia biol. (Praha) 16, 196 (1970).

⁹ R. J. KRAEMER und D. S. COFFEY, Biochim. biophys. Acta 224, 553 (1970).

¹⁰ K. TEMPEL und K. ZIPF, Klin. Wschr. 47, 165 (1969).

¹¹ W. REGELSON, Adv. Chemother. 3, 303 (1968).

¹² W. REGELSON und J. F. HOLLAND, Nature, Lond. 187, 46 (1958).

¹³ K. TEMPEL, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. Suppl. 274, R 115 (1972); Zentbl. VetMed., Reihe A, im Druck.

¹⁴ K. TEMPEL und K. BEURER, Strahlentherapie 147, 106 (1971).

5,13, 27 bzw. 38 % (DNA) oder 23,19, 20 bzw. 39 % (PVS) ($n = 5$) vermindert. Nicht dosisabhängig verhielt sich der gleichzeitig registrierte, maximal 200 %ige Aktivitätszuwachs im Serum.

Diskussion. Nicht oder schwer abbaubare Makromoleküle, wie Dextran¹⁵ und makromolekulare Schwefelsäureester¹⁶⁻¹⁸, werden u.a. in der Niere, in grösserem Umfange allerdings in Leber und Milz gespeichert. RNA wird nach parenteraler Gabe grösstenteils abgebaut¹⁹, der Rest verteilt sich unter anderem auf Milz, Leber und Niere²⁰. Unter vergleichbaren Bedingungen bleibt ein beträchtlicher Teil der DNA (Rubachev et al.²¹ veranschlagen ihn aufgrund von Versuchen an der Ratte auf 35-40 %) makromolekular oder in Form grösserer Fragmente in Organen des Säugers (unter anderem in der Leber sowie in solchen mit hoher Proliferationstendenz) zurück. Die unter diesen Voraussetzungen nachträglich in den DNase I-Testansatz gelangenden Polyanionen-Mengen liegen vorwiegend um 1-2 Grössenordnungen unter den in vitro¹⁰ wirksamen (ca. 25 %ige Hemmung durch 6,5 µg PVS oder 420 µg SP₅₄ pro 1,0 ml Ansatz) Polyanionenkonzentrationen.

Zeitlicher Verlauf der DNase I-Reaktion in Serum und Harn von Ratten^{22, 23} und Gegenläufigkeit der Aktivitätsänderungen in den Verteilungsräumen Serum und Niere bei der Maus unter dem Einfluss von Polyanionen, GKB und TEM verweisen auf die ursächliche Beteiligung von Umverteilungsphänomenen. Als alleinige Ursache der geschilderten Polyanioneneffekte scheiden sie allerdings aufgrund der bisher vorgelegten Befunde^{13, 14} aus. Davon abgesehen, stellen in vitro- und in vivo-Befunde zur Wirkung von makromolekularen Schwefelsäureestern¹⁻⁶ und Nukleinsäuren (vor allem der RNA)¹⁹ einen unmittelbaren Eingriff der untersuchten Polyanionen in die

Synthese der DNase I zur Diskussion. Die Entscheidung zwischen beiden Alternativen setzt die Markierung des Enzyms in Serum und Niere voraus.

Summary. Induction of DNase I by total-body X-irradiation and/or 2,4,6-triethyleimino-1,3,5-triazine within kidneys of mice has been inhibited by heparin-like polyanions and enhanced by nucleic acids.

K. TEMPEL und M. WULFFIUS

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, Königinstrasse 16, D-8 München 22 (Deutschland), 1. Februar 1973.

- ¹⁵ K. H. EBERT, G. SCHENK und R. SCHOLZ, Z. klin. Chem. 6, 435 (1968).
- ¹⁶ E. HUSEMANN, B. PFANNMÜLLER und W. HERTLEIN, Experientia 9, 379 (1953).
- ¹⁷ E. HUSEMANN, B. PFANNMÜLLER, H. SCHILL und W. HERTLEIN, Z. Naturf. 12b, 427 (1957).
- ¹⁸ R. TAUGNER, K.-P. KARSUNKY und J. METZ, Archs int. Pharmacodyn. Thér. 189, 250 (1971).
- ¹⁹ P. M. BHARGAVA und G. SHANMUGAM, Prog. nucl. Acid Res. molec. Biol. 11, 104 (1971).
- ²⁰ S. SVED, Can. J. Biochem. 43, 949 (1965).
- ²¹ P. G. RUBACHEV, T. A. FEDOROVA, V. K. MAZURIKI, und A. M. SKURIKHINA, Stud. Biophys. 29, 153 (1971).
- ²² O. D. KOWLESSAR, K. I. ALTMAN und L. H. HEMPELMANN, Arch. Biochem. Biophys. 52, 362 (1954).
- ²³ O. D. KOWLESSAR, J. I. ALTMAN und L. H. HEMPELMANN, Arch. Biochem. Biophys. 54, 355 (1954).

Plasma Hippuryl-L-Lysine Hydrolase in Tourniquet Shock

It has been reported that the sera or plasma of many animals including human contain a carboxypeptidase which cleaves basic C-terminal amino acids and hydrolyses hippuryl-L-lysine (HLL), hippuryl-L-arginine and other peptides¹. This enzyme was named carboxypeptidase N, which can be distinguished from the pancreatic carboxypeptidase. Lower levels of hippuryl-L-lysine (HLL) hydrolase in heparinized plasma have been noted in anaphylactic¹ and endotoxin shock². The author observed that

this enzyme also decreased in tourniquet shock and that adding aliquots of ultrafiltrated plasma obtained after release of the tourniquets to normal plasma led to a reduction of this enzyme activity. All of these results suggest that

- ¹ E. G. ERDÖS, E. M. SLOANE and I. M. WOHLER, Biochem. Pharmac. 13, 893 (1964).
- ² E. G. ERDÖS, H. Y. YANG, L. L. TAGUE and N. MANNING, Biochem. Pharmac. 16, 1287 (1967).

Table I. Hydrolysis of HLL in plasma before and after application of the tourniquets

Experiment	Enzyme solutions	Before	After release of the tourniquets (min)		
			10	30	60
A)	Plasma 0.1 ml	100	81	61	67
B)	Normal plasma 0.1 ml + Ultrafiltrate 0.01 ml	100	86	72	79

In the experiments A), HLL hydrolysis in plasma is expressed as percent activity and its activity in plasma obtained before application of the tourniquets is 100%. In the experiments B), HLL hydrolysis in normal plasma + ultrafiltrate obtained before application of the tourniquets is 100%.

Table II. Inhibition of plasma HLL hydrolase by corticosteroids and serotonin^a

Concentration (M)	Corticosteroids				Serotonin
	Hydrocortisone ^b	Prednisolone ^c	Dexamethasone ^d	Beta-methasone ^e	
10 ⁻⁸	100	100	100	100	100
10 ⁻⁷	95	94	89	100	95
10 ⁻⁶	87	88	74	94	85
10 ⁻⁵	68	78	51	71	74
10 ⁻⁴	41	55	23	43	57

^a HLL hydrolysis in samples is expressed as percent activity and HLL hydrolysis in plasma alone is 100%. ^b Solu-Cortef. ^c Predonine ^dDEXA-Sheroson. ^e Rinderon.