

solution. A slight milkish opalescence was to be seen with a protamin amount of 0.5 mg. This opalescent liquid precipitated after centrifugation into a whitish crystalline sediment, which could be suspended by stirring in water or plasma. If this substance is the result of the reaction between protamin and heparin, it is easy to understand that the plasma liberated from heparin by the addition of an appropriate amount of protamin undergoes the normal coagulation phases.

At the end of this short report we conclude that protamin sulfate offers sufficiently favourable characteristics as a coagulation means for the nutritional medium, and consequently its use appears justified for the *in vitro* cultures of hematopoietic tissues. We have therefore initiated experiments in order to establish whether such procedure does not interfere with the normal behaviour of the functional activities of the explanted cells.

GIOVANNI ASTALDI and JENNY FRANKO

Department of Internal Medicine, University of Pavia,
December 1, 1949.

Zusammenfassung

Die Autoren haben sich die Aufgabe gestellt, eine Substanz zu suchen, die an Stelle der embryonalen Extrakte den zur Kultur von hämatopoietischem Gewebe nötigen Nährboden koagulieren kann. Zu diesem Zwecke haben sie die Fähigkeit des Protaminsulfats, menschliches, heparinisiertes Plasma zu koagulieren, untersucht. Hierbei wurde festgestellt, welches die optimalen Konzentrationen und die Grenzmengen des Protaminsulfats sind, die zur Gerinnung des Plasmas führen. Ferner wurde die Gerinnungszeit bei verschiedenen Protaminmengen, der Einfluß der Temperatur auf die Koagulationsgeschwindigkeit sowie die Zeitspanne, in der die Zugabe von Protamin jedoch noch imstande ist, heparinisiertes Plasma zur Gerinnung zu bringen, bestimmt.

Zytochemischer Nachweis der Adenosintriphosphatase (ATP-ase) in den Zellen des Asictestumors der Maus

Während einer Untersuchung über den Ribonucleinsäuregehalt (RNS) der Zellen des Ascitestumors der Maus ergaben Versuche mit der Gomori-Reaktion, daß die Zellen keine alkalische Phosphatase enthielten. An bestimmten epithelialen Tumoren kamen KABAT und FURTH¹ und MANHEIMER und SELIGMAN² zu gleichen Befunden. Da sich unser Testobjekt frei von alkalischer Phosphatase zeigte, wurde es für die Untersuchung auf ATP-ase gewählt, nachdem Herr Prof. LETTRÉ mich anregte, das Enzym zytochemisch nachzuweisen.

Methode. Der Ascitestumor der Maus ist eine Abart des Ehrlichschen Mäusekarzinoms und entsteht durch intraperitoneales Verimpfen der Zellen³. Es bildet sich dabei ein Transsudat in der Bauchhöhle, in dem sich die Zellen frei beweglich vermehren. Durch Punktion der Ascitesflüssigkeit läßt sich Tumormaterial gewinnen. Die Lebenszeit der Tiere beträgt infolge des starken Ascites etwa 15 Tage.

¹ E. A. KABAT und J. FURTH, Amer. J. Path. 17, 303 (1941).

² L. H. MANHEIMER und A. M. SELIGMAN, J. Natl. Canc. Inst. 9, 181 (1948).

³ H. LETTRÉ, Z. Physiol. Chem. 268, 59 (1941).

Von ungefähr 50 weißen Mäusen mit Ascitestumoren verschiedenen Alters wurden pro Tier 8–10 Ausschläge angefertigt und bei Zimmertemperatur luftgetrocknet. Die Hälfte der Präparate diente als Kontrolle.

ATP-ase wurde mit der von GLICK¹ modifizierten Gomori-Reaktion nachgewiesen. Zu jedem Versuch lief als Kontrolle die Gomori-Reaktion² auf alkalische Phosphatase. Als Substrate dienten Na-Glycerophosphat und Adenosintriphosphorsäure (ATP)³. Die Versuchslösung zum Nachweis der alkalischen Phosphatase hatte einen p_H -Wert von 9,4 und die für ATP-ase einen p_H -Wert von 9,0. Als Puffer wurde Veronal-Na benutzt. Die günstigste Bebrütungszeit betrug 5 Stunden. Die Reaktion auf alkalische Phosphatase blieb auch nach 24-stündiger Inkubation negativ. In den Kontrollausstrichen wurden die organischen Phosphatlösungen durch destilliertes Wasser ersetzt. Bei einem Teil der Präparate kam als Gegenfärbung die Feulgen-Nuklear-Reaktion zur Anwendung.

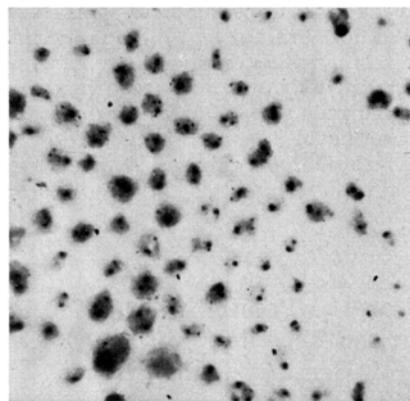


Abb. 1. Gomori-Reaktion auf ATP-ase. Mikrophotographie, Vergr. etwa 1000mal.

Resultate. Die stärkste ATP-ase-Reaktion gaben die Nucleoli der Tumorzellen (Abb. 1). Die Stärke der Schwärzung nahm in der Reihenfolge Nukleolus, Nucleus, Zytoplasma ab. Wie die Aufnahme zeigt, war letzteres in manchen Zellen negativ. Daß die Orte der ausgeprägtesten Schwärzung in den Zellen den Nucleolen entsprachen, konnte durch Beobachtungen mit dem Phasenkontrastmikroskop erhärtet werden.

Im Gegensatz zu diesen 2–8 Tage alten Ascitestumoren fiel der ATP-ase-Gehalt etwa vom achten Tag an in allen Zellen zuerst im Zytoplasma ab, dann folgten Nucleus und Nucleolus. In 12–14 Tage alten Tumoren bildeten die Nucleolen die einzigen färbaren Zellstrukturen.

Abb. 2 zeigt eine vierkernige Zelle aus einem 9 Tage alten Tumor mit negativem Zytoplasma, wobei von dem vierten Kern nur noch der Nucleolus sichtbar ist. Das gleiche Verteilungsmuster besitzen bemerkenswerterweise auch jüngere multinukleäre Zellen. Sie haben im Gegensatz zu ihren gleichaltrigen ein- oder zweikernigen Zellen ihre zytoplasmatische ATP-ase verloren.

Daß außer Zytoplasma und Kern auch die Kernkörperchen die Fähigkeit verlieren können, ATP zu

¹ D. GLICK und E. E. FISCHER, Arch. Biochem. 8, 91 (1945). – D. GLICK, *Techniques of Histo- and Cytochemistry* (Interscience Publishers, New York, 1949).

² G. GOMORI, Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 42, 23 (1939).

³ Die ATP stammte von der Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio.

spalten, demonstriert die Riesenzelle der Abb. 3 eines 11 Tage alten Tumors, in der mit Sicherheit 15 Kerne gezählt werden konnten. Das Präparat wurde nach FEULGEN gegengefärbt, was ohne Schaden für die Gomori-Reaktion ist, wie DANIELLI und CATCHESIDE¹

GLICK und FISCHER¹ übereinstimmt. Sie wiesen 1946 mit der von ihnen modifizierten Gomori-Reaktion einen ATP-ase-Gehalt in den Nucleoli von Weizenkeimlingen nach. Ferner stellten GLICK und LUSHBAUGH² in Muskeln und Ganglien von *Periplaneta americana* ATP-ase dar.

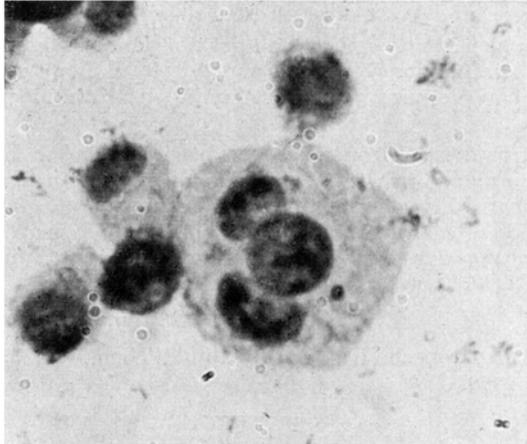


Abb. 2. Gomori-Reaktion auf ATP-ase. Mikrophotographie. Vergr. etwa 2000mal.

zeigen konnten. Während die der Riesenzelle benachbarten Zellen eine purpurbraune Kernfärbung besaßen, erschienen die Kerne bei dieser im bekannten Violett der Feulgen-Reaktion. Am oberen Rand der Zelle befindet sich ein Kern in der Metaphase, eine Beobachtung, die an multinukleären Zellen dieses Tumors oft gemacht werden kann.

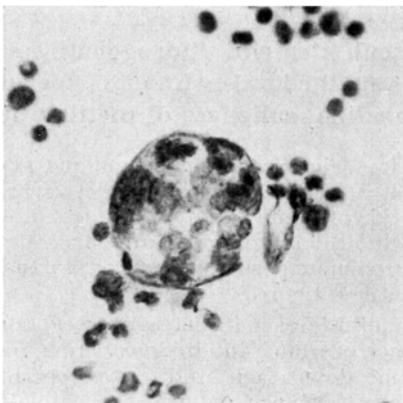


Abb. 3. Gomori-Reaktion auf ATP-ase. Gegenfärbung nach FEULGEN. Mikrophotographie. Vergr. etwa 1000mal.

Bei zwei Tumoren gaben die Chromosomen eine positive Reaktion auf ATP-ase, wie die Metaphase der Abb. 4 zeigt. Die Feulgen-Reaktion bestätigte den Befund.

Wurden die Zellen in Abwesenheit von ATP unter gleichen Bedingungen behandelt, so blieben die Schwärzungen in den oben beschriebenen Strukturen aus (Abb. 5).

Diskussion. Wie gezeigt wurde, findet sich die stärkste Konzentration der ATP-ase in den Nucleoli der untersuchten Zellen, was mit den Ergebnissen von

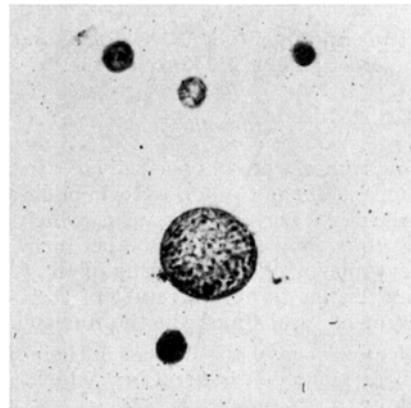


Abb. 4. Gomori-Reaktion auf ATP-ase. Mikrophotographie. Vergr. etwa 1000mal.

Die Tatsache, daß mit dem Alter der Ascitestumorzellen die ATP-ase und die RNS³ des Zytoplasmas abnimmt und gleichzeitig die Mitoserate³ fällt, läßt auf einen Zusammenhang zwischen ATP-ase und Zellteilung schließen.

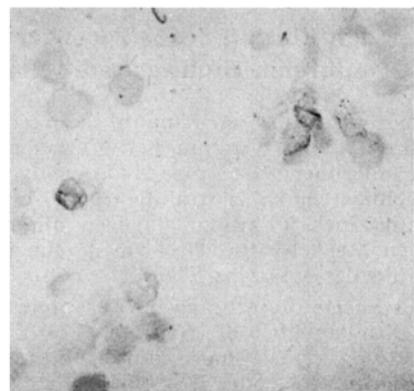


Abb. 5. Gomori-Reaktion auf ATP-ase in Abwesenheit von ATP. Mikrophotographie. Vergr. etwa 1000mal.

Über den zytochemischen Nachweis von ATP-ase in den Chromosomen wurde noch nichts veröffentlicht, jedoch konnte alkalische Phosphatase in den Chromosomen bei Hühnerherzfibroblasten *in vitro* von WILLMER⁴, von KRUGELIS in den sich entwickelnden Samenzellen des Mäusehodens⁵ und in Speicheldrüsenzellen von *Drosophila*⁶ und gleichfalls bei letzteren von DANIELLI und CATCHESIDE⁷ nach GOMORI dargestellt werden. Daß der Nachweis der ATP-ase nur in zwei Fällen in den

¹ D. GLICK und E. E. FISCHER, Arch. Biochem. 11, 65 (1946).

² D. GLICK und C. C. LUSHBAUGH, Science 103, 599 (1946).

³ C. LANDSCHÜTZ, unveröffentl. Versuche.

⁴ E. W. WILLMER, J. Exptl. Biol. 19, 11 (1942).

⁵ E. J. KRUGELIS, J. Cell. Comp. Physiol. 19, 1 (1942).

⁶ E. J. KRUGELIS, Genetics 30, 12 (1945).

⁷ J. F. DANIELLI und D. G. CATCHESIDE, Nature 156, 294 (1945).

Chromosomen gelang, könnte an dem langen Aufenthalt der Zellen in einer Flüssigkeit bei p_H 9 liegen. Hierbei kann die Chromosomenstruktur zerstört werden, worauf MOOG¹ hinwies.

Herrn Prof. LETTRÉ bin ich für seine Unterstützung und sein Interesse, das er der Arbeit entgegenbrachte, zu großem Dank verpflichtet.

CHRISTOPH LANDSCHÜTZ

Institut für experimentelle Krebsforschung der Universität Heidelberg², den 25. Januar 1950.

Summary

ATP-ase is demonstrated in the cells of ascites tumor of mice by means of the Gomori cytochemical technique modified by GLICK. The concentration, which is highest in the nucleoli, is somewhat less in the nuclei, and still less in the cytoplasm. With the aging of the tumors the concentration begins to decrease first in the cytoplasm, next in the nuclei, and finally in the nucleoli.

Multinuclear cells have no ATP-ase in their cytoplasm. A multinuclear giant cell is described which is entirely free of ATP-ase.

With two tumors it has been possible to demonstrate the presence of ATP-ase in the Chromosomes.

The facts described are compared with results in the literature.

¹ F. MOOG, Biol. Bull. 86, 51 (1944).

² Gegenwärtige Anschrift: Institut für Virusforschung, Heidelberg.

Über den Einfluß des α -Tocopherols auf den Stoffwechsel

Die Frage nach dem Angriffspunkt des α -Tocopherols bei den durch dieses Vitamin hervorgerufenen Stoffwechselveränderungen ist noch nicht geklärt. Einige Autoren nehmen einen zentral-dienzephal-hormonalen Angriffspunkt an¹. MARKEES hingegen nimmt zumindest für den Muskelstoffwechsel einen rein peripheren Angriffspunkt des Vitamins E an².

Uns interessierte diese Frage im Zusammenhang mit klinischen Studien über die Wirkung des Vitamins E bei Hyperthyreose. Die hiezu durchgeföhrten Untersuchungen hatten folgendes Ergebnis:

1. Eine durch Thyroxin erzeugte hohe Kreatinurie bei Ratten wird durch Vitamin E beträchtlich vermindert.

2. Der nach Thyroxin (nicht ganz regelmäßig) gesteigerte O_2 -Verbrauch im isolierten Muskel wird durch Vitamin E nahezu immer deutlich vermindert³.

3. Zur Prüfung der Frage, ob diese den erhöhten peripheren Sauerstoffverbrauch hemmende Wirkung nur auf die Muskulatur beschränkt ist, ließen wir Leberschnitte von Ratten, die an drei vorangegangenen Tagen je 0,5 mg/100 g Tiergewicht Thyroxin erhalten hatten, im Warburg-Apparat atmen. Der Hälften der Tiere war außerdem zweimal je 10 mg/100 g Tiergewicht Ephynal (Hoffmann-La Roche) injiziert worden. — Wir konnten

dabei keine signifikanten Unterschiede im Sauerstoffverbrauch der Leberschnitte zwischen den beiden Gruppen feststellen.

4. Als weiteren Test benützten wir die Retikulozytenkrise und die damit verbundene erhöhte Sauerstoffatmung des Blutes nach Schilddrüsenzufuhr (über Methode und Wert dieses Testes siehe⁴).

Bei gleichzeitiger Ephynalinjektion fanden wir weder eine signifikante Verminderung der Retikulozytenzahl noch eine Verminderung der Atmung der Retikulozyten an sich.

Durch diese Untersuchung ist bewiesen, daß in Übereinstimmung mit S. MARKEES² das Vitamin E eine peripher stoffwechselhemmende Wirkung auf die Muskulatur ausübt. Ein Anhaltspunkt für eine übergeordnete Steuerung der Stoffwechselwirkung des Vitamins E konnte nicht gefunden werden.

H. BRAUNSTEINER und F. MLCZOCHE

II. Medizinische Universitätsklinik, Wien, den 25. Januar 1950.

Summary

The creatinuria induced by thyroxin in rats can be significantly diminished by vitamin E. The increased O_2 -consumption of liver slices and of erythrocytes during reticulocyte crises of thyroxin-treated animals is not influenced by this vitamin. These experimental findings prove the peripheral metabolic activity of vitamin E, whereas a central effect on metabolism cannot be detected.

¹ H. BRAUNSTEINER und F. MLCZOCHE, Wiener Z. inn. Med., im Druck (1950).

² S. MARKEES, Helv. med. acta 15, 528 (1948).

Effetti degli alcaloidi diidrogenati del *secale cornutum* sugli edemi polmonari sperimentali da adrenalina, salicilato di metile e tiourea

Nel quadro delle ricerche che ovunque si compiono allo scopo di precisare la patogenesi dei vari edemi polmonari sperimentali mi è sembrato interessante studiare l'azione degli alcaloidi diidrogenati del *secale cornutum* sugli edemi polmonari sperimentali da adrenalina, salicilato di metile e tiourea.

Gli alcaloidi diidrogenati del *secale cornutum* (Hydergin) (diidrococornina, diidroergocristina, diidroergocriptina) sono dovuti agli studi critico sperimentali di STOLLE, HOFMANN¹, e ROTHLIN². Le complete osservazioni di ROTHLIN hanno accertato negli organi isolati e nel ratto una notevole attività simpaticolitica anche di fronte a concentrazioni notevoli di adrenalina. Un intervento del sistema nervoso viene spesso invocato nell'interpretazione dell'edema sperimentale da adrenalina. Del tutto oscura è invece la patogenesi dell'edema polmonare da salicilato di metile (CHATIN-GUINERD³) e da tiourea (RICHTER e CLISBY⁴, DRINKER e JONES⁵, rendendo interessante lo studio dell'influenza che possono spiegare i suddetti alcaloidi su questa varietà di edemi polmonari sperimentali.

¹ A. STOLL e A. HOFMANN, Helv. chim. acta 26, 2070 (1943).

² E. ROTHLIN, Helv. physiol. acta 2, C 48 (1944).

³ M. M. CHATIN e L. GUINARD, C. R. Séanc. et Soc. Biol. p. 669, 1900.

⁴ P. RICHTER e H. CLISBY, Arch. Path. 33, 46 (1942).

⁵ C. K. DRINKER e S. JONES, Path. Bact. 58, 483 (1946).

¹ C. BIDDULPH und R. K. MEYER, Amer. J. Phys. 132, 259 (1941); Endocrinology 30, 551 (1942). — P. BORMAN und H. A. HEINSEN, Dtsch. Arch. klin. Med. 193, 157 (1948).

² S. MARKEES, Helv. med. acta 15, 528 (1948).

³ H. BRAUNSTEINER und F. MLCZOCHE, Wiener Z. inn. Med. Mai 1950.