

reicheres Tatsachenmaterial vorliegt. Aus diesem Grunde halten wir es für zweckmäßig, die von uns gefundenen Gebilde vorderhand als globuläre Partikel zu bezeichnen.

F. E. LEHMANN

Zoophysiologische Abteilung des zoologischen Instituts der Universität Bern, den 6. Juni 1950.

### Summary

It is shown with the electron microscope that in the cytoplasm of different animal types globular particles occur. The organ-forming polarplasm of *Tubifex* contains particles of 30–100  $\mu$  diameter. From this population seem to develop two different populations of particles, one in the somatoblast 2d with small globules and the other one in the somatoblast 4d, which contains also rather large bodies (600  $\times$  300  $\mu$ ). The plasmalemma of *Amoeba proteus* seems to be a film, mainly formed by small globular particles, whereas in the ectoplasm a three-dimensional network occurs, containing chains of larger globules.

### Gewebsmastzellen und Heparin<sup>1</sup> (Phasenmikroskopische Untersuchung)

Das Heparin steht heute als wichtiges Anticoagulans im Brennpunkt des Interesses bei der Thromboseprophylaxe (s. KOLLER<sup>2</sup> u. a.). Ferner spielt das Heparin beim Schock eine Rolle, da es für die Ungerinnbarkeit des Blutes verantwortlich ist (WILANDER<sup>3</sup>). Damit muß auch der Entstehungsort dieses Stoffes interessieren, denn umgekehrt kann man vielleicht aus dem morphologischen Bild der Bildungszellen auf die Biologie der Heparinausschüttung schließen.

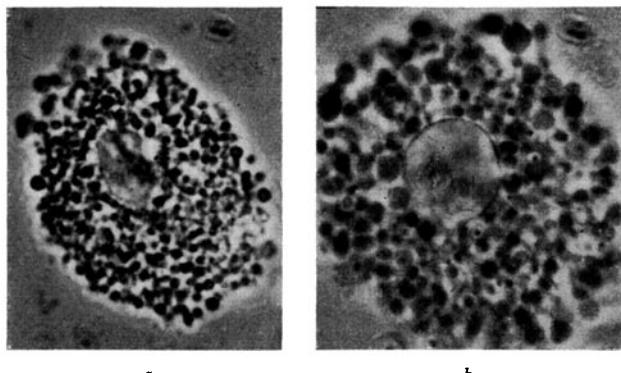


Abb. 1a. Peritonealmastzelle, der Maus frisch entnommen und in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Der Kern ist teilweise von den glänzenden, doppelt konturierten Granula überdeckt. Ungefärbt, Pm 1400  $\times$ .

Abb. 1b. Dieselbe Mastzelle wie Abb. 1, aber nach Hinzufügen von reichlich destilliertem Wasser: Die Granula und der Kern stark gequollen. Granula ungleich groß und mattgrau, Verlust der Brillanz. Sonst wie Abb. 1a.

Es besteht heute wohl insofern Einigkeit, als in den Gewebsmastzellen (Mz) die Heparinträger (SCHÜRRER<sup>4</sup>) und vermutlich auch seine Bildner erblickt werden

(OLIVER, BLOOM und MANGIERI<sup>1</sup>). Man glaubte bisher, daß die Granula der Mz gewissermaßen Heparintropfen seien. Im Gegensatz zu dieser Auffassung haben JULÉN, SNELLMAN und SYLVEN<sup>2</sup> kürzlich auf Grund chemischer und elektronenoptischer Untersuchungen behauptet, das Heparin sei nicht in den Granula selbst, sondern in der homogenen Grundsubstanz bzw. den Mikrosomen des Protoplasmas lokalisiert.

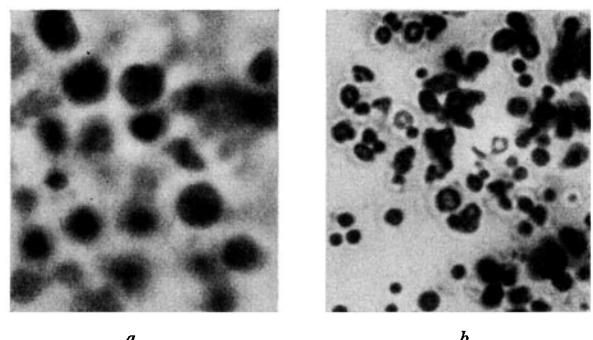


Abb. 2a. Ungleiche Tönung und irreguläre Form der Granula nach längerem Verweilen in destilliertem Wasser. Pm 2000  $\times$ .

Abb. 2b. Mastzellgranula nach Aufschwemmung in destilliertem Wasser durch Toluidinblau gefärbt. Das Granulazentrum meist deutlich heller als die Randzone (im Original keine Metachromasie vorhanden). Pm 1400  $\times$ .

**Eigene Untersuchungen.** Der frische Peritonealabstrich von Mäusen enthält zahlreiche freie Mz, während fixierte Mz im Netz studiert werden können. Im Phasenmikroskop (Pm) erscheinen die Granula als brillante runde Kugeln, welche sehr dicht gelagert sind und den Kern oft überdecken (Abb. 1a). Bei Zugabe von destilliertem Wasser unter dauernder mikroskopischer Beobachtung<sup>3</sup> erkennt man ein plötzliches «Platzen» der Granula und ein Verschwinden ihrer Brillanz. Der übrigbleibende Teil der Granula schrumpft zuerst für ein bis zwei Sekunden sehr stark, schwoll dann nachher. Nach zwei bis drei Sekunden ist die ganze Zelle sehr stark vergrößert und ihre Granula sind nunmehr homogen, grau (Abb. 1b). Die Brillanz ist verschwunden. Der Durchmesser solcher Granula beträgt ein Vielfaches der ursprünglichen glänzenden Granula. Die Gestalt dieser Elemente ist oft etwas unregelmäßig. Sie sind nicht ganz rund, sondern polymorph, auch kommt die von MAXIMOW schon betonte unterschiedliche Größe der Granula noch sehr viel deutlicher zum Ausdruck. Nicht selten kann ferner in einigen der geschwollenen Gebilde eine partielle Wandverdickung festgestellt werden (Abb. 2a). Gibt man zu diesen Gebilden eine 10%ige Ammoniaklösung, so löst sich die intergranuläre Grundsubstanz völlig auf und die Granula schwimmen meist weg. Die wenigen fest am Deckglas haftenden Granula werden von Ammoniak bis auf amorphe kleine Reste gelöst. Diese geschwollenen Granula bestehen demnach wahrscheinlich zum größten Teil aus Eiweißkörpern, welche an ähnliche ammoniakunlösliche Verbindungen gekoppelt sind. Es liegt nahe, einen Lipoid-Eiweißkomplex als wahrscheinlichen Baustein des Granulagerüstes anzusehen. – Die Granula von Mz, welche 1–2 Stunden unter Verdunstungsschutz in physiolog-

<sup>1</sup> J. OLIVER, F. BLOOM und C. MANGIERI, J. Exp. Med. 86, 107 (1947).

<sup>2</sup> CH. JULÉN, O. SNELLMAN und B. SYLVEN, Acta physiol. Scand. 19, 289 (1950).

<sup>3</sup> H. ZOLLINGER, Amer. J. Path. 24, 569 (1948) und Exper. 4, 312 (1948).

<sup>1</sup> Der Emil-Barell-Stiftung zur Förderung der akademisch-wissenschaftlichen Forschungen danken wir für ihre Unterstützung.

<sup>2</sup> F. KOLLER, Helv. med. acta 16, 184 (1949).

<sup>3</sup> O. WILANDER, Scand. Arch. Physiol. 81, Suppl. 15 (1938).

<sup>4</sup> W. SCHÜRRER, Helv. med. acta 13, 161 (1946).

gischer Kochsalzlösung suspensierte waren, zeigen ebenfalls Verlust der Brillanz und eine deutliche Schwellung. Eigentliche bläschenförmige Granula, wie wir sie nach Zufügung von destilliertem Wasser oder bei längerem Verweilen in physiologischer Kochsalzlösung aus Mitochondrien entstehen gesehen haben, konnten hier nicht festgestellt werden. Der Vorgang ist insofern reversibel, als die Granula bei Wiederherstellung der osmotischen Isotonizität wieder schrumpfen, doch erscheint die Brillanz nicht mehr.

Schon diese einfachen Versuche lehren, daß die Granula einen wasserlöslichen Stoff enthalten, welcher ihnen Brillanz gibt. Daneben bestehen die Granula aus einem Grundgerüst, welches uns weiter unten beschäftigen soll.

Zur Abklärung der Natur der brilliant erscheinenden Substanz verwendeten wir die Metachromasie bei Färbung mit Toluidinblau (JORGES<sup>1</sup>). Werden ganz frisch entnommene Mz mit Toluidinblau gefärbt, so färben sich die Granula eindeutig metachromatisch rot, wie dies kürzlich auch SCHÜRER<sup>2</sup> wiederum betont hat. Das intergranuläre Zytoplasma färbt sich dabei zuerst nicht, wie man dies besonders schön an dem etwas ausgebreiteten Mz des Netzes beobachten kann. Die Suspensionsflüssigkeit bleibt rein blau. Bringt man die Mz jedoch vor der Färbung in Wasser, so fehlt die Metachromasie, d. h. die Granula färben sich tiefblau, dagegen kann nun gelegentlich eine Rotfärbung des intergranulären Plasmas und des umliegenden Gewebes beobachtet werden. Auch nimmt die Suspension einen rotvioletten Farbton an. Bei lockerer Lagerung der Granula konnten wir, ebenso wie LEHNER<sup>3</sup>, oft eindeutig eine schalenförmige, tiefblaue Außenzone und ein großes helleres Zentrum in den Granula erkennen (Abb. 2 b). Werden Mz nach längerer Lagerung in physiologischer Kochsalzlösung (30 Minuten bis 2 Stunden) mit Toluidinblau gefärbt, so nehmen ihre Granula ebenfalls einen tiefblauen Ton an.

Damit dürfte bewiesen sein, daß die Granula der Mz Heparin enthalten, welches durch destilliertes Wasser und auch durch längeres Lagern in physiologischer Kochsalzlösung herausgelöst wird. Dieser letzte Punkt ist insofern wichtig, als er dazu angetan ist, die Diskrepanz zwischen unsrern Beobachtungen und denjenigen von JULÉN *et al.*<sup>4</sup> zu erklären. Zur Separierung der Granula mußten nämlich diese Autoren die zerstörten Zellen und auch die separierten Granula in physiologischer Kochsalzlösung aufschwemmen. Es darf demnach nicht erstaunen, wenn sie das Heparin außerhalb der Granula gefunden haben. Dasselbe gilt für die histologischen Schnitte, denn das Material mußte ja in wasserhaltiger Flüssigkeit fixiert werden. Dagegen haben unsere Versuche die Angaben von JULÉN *et al.*<sup>4</sup> insofern bestätigt, als die Mz-Granula nicht im eigentlichen Sinne des Wortes aus Heparin bestehen; sondern sie zeigen ein wasserunlösliches, aber quellbares Gerüstwerk, in dessen Innern das Heparin abgelagert ist.

Die von JULÉN und Mitarbeitern<sup>4</sup> entwickelte Theorie der extragranulären Heparinlokalisation scheint uns auch im Lichte der neueren Forschung über die Art der Heparinausschüttung sehr fragwürdig. Bei akutem Thrombokinaseschock konnte RUTH FRICK<sup>5</sup> in unserem

Institut ein Ausstreuen der Mastzellgranula im Meso der Maus nachweisen (Klasmatose: MAXIMOW); auch PAFF und BLOOM<sup>1</sup> haben unabhängig von uns dieselbe Beobachtung gemacht. Zudem zeigen frisch suspendierte und nicht lädierte Mz recht häufig ein langsames Ablösen einzelner Granula, und zwar ohne Veränderung der Zellkontur und ohne Zerreissen der Zellmembran (Abb. 1a). Dieses Ausstreuen der Granula kann doch nur dann zu Heparinausschüttung führen, wenn die Granula auch die Träger des Heparins sind.

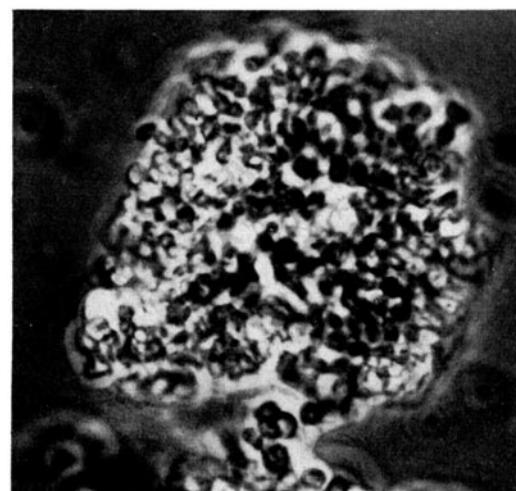


Abb. 3. Hochgradige brillante und ganz unregelmäßig geformte Granula im Leib einer Mastzelle nach Einwirkung von 0,1% Ribonuklease und nachheriger Aufschwemmung in destilliertem Wasser. Pm 1400 x.

Damit wenden wir uns wiederum der Frage nach der Natur des Granulagerüstwerkes zurück. Aus Desoxyribonukleoprotein kann das Gerüst nicht bestehen. Jedenfalls verändern die Granula ihre Gestalt weder bei Suspension in Wasser noch in physiologischer Kochsalzlösung nach Zugabe von 0,5%iger Desoxyribonuklease. Daß das Ferment an sich in wirksamer Konzentration angewandt wurde, beweist in diesen Versuchen das Verschwinden des Chromatinnetzwerkes in benachbarten Zellkernen. Komplizierter liegen die Verhältnisse beim Ribonukleoprotein. Die Zugabe von Ribonuklease bewirkt vorerst keine Granulaveränderung. Wird jedoch nachträglich destilliertes Wasser zugegeben, so werden die Granula eher etwas größer, ihre Brillanz verstärkt sich jedoch irreversibel (Abb. 3). Diesen paradoxen Effekt können wir bis heute noch nicht erklären, denn bei Mitochondrien z. B. löst die Ribonuklease den aus Ribonukleoprotein bestehenden Mitochondrienkörper vollständig auf<sup>2</sup>. Wir schließen aus diesen Versuchen, daß die Mz-Granula keine größeren Mengen von Ribonukleoprotein enthalten. Ein Schluß, der auch durch die gleichlautenden Befunde von WISLOCKI<sup>3</sup> *et al.* gestützt wird.

Die Reaktion der heparinentblößten, in Wasser befindlichen großgrauen Mz-Granula auf Essigsäure und Alkohol stimmt mit dem Verhalten der Mitochondrien, wie wir es früher beschrieben haben, überein. Der beschriebene Vorgang der Schwellung der Granula in destilliertem Wasser und nach längerem Verweilen in

<sup>1</sup> J. JORGES, *Heparin* (Oxford Univ. Press, 2. Aufl., 1946).

<sup>2</sup> W. SCHÜRER, *Helv. med. acta* 13, 161 (1946).

<sup>3</sup> J. LEHNER, *Erg. Anat.* 25, 67 (1924).

<sup>4</sup> CH. JULÉN, O. SNELLMAN und B. SYLVEN, *Acta physiol. Scand.* 19, 289 (1950).

<sup>5</sup> R. FRICK, *Acta Haematologica* 4, 97 (1950).

<sup>1</sup> G. PAFF und F. BLOOM, *Anat. Rec.* 104, 45 (1949).

<sup>2</sup> H. ZOLLINGER, *Exper.* 6, 14 (1950).

<sup>3</sup> G. WISLOCKI, H. BUNTING und E. DEMPSEY, *Anat. Rec.* 98, 527 (1947).

physiologischer Kochsalzlösung deckt sich ebenfalls weitgehend mit den Veränderungen, welche wir bei trüber Schwellung in anderen Zellen verfolgen konnten. Weiter spricht die partielle Wandverdickung der geschwollenen Granula (siehe Abb. 2 a) für eine ähnliche Struktur, wie wir sie für die Mitochondrien festgestellt haben. Und schließlich sollen nach COWDRY<sup>1</sup> u. a. alle lebenden Zellen der Fauna und der Flora Mitochondrien enthalten. Da wir jedoch neben den Mz-Granula keine weiteren korpuskulären Protoplasmaelemente finden konnten, scheint es uns wahrscheinlich, daß die Mz-Granula durch Heparinspeicherung umgewandelte Mitochondrien sind.

H. U. ZOLLINGER

Pathologisches Institut der Universität Zürich, den  
15. April 1950.

### Summary

Cytologic investigation with the phase microscope in connection with toluidinblue stain shows that the granules of the peritoneal mast cells contain heparin. These granules release the heparin *in vitro* immediately if suspended in distilled water and more slowly when suspended in physiological saline. A granular skeleton remains which apparently consists of protein. The presence of ribose- or desoxyribosenucleoprotein could not be proved. It seems highly probable that the heparin-containing granules of mast cells represent a special form of mitochondria.

<sup>1</sup> E. COWDRY, *General Cytology* (Univ. Chicago Press, Chicago, 1924).

# Sur l'action biochimique des esters amides polyphosphoriques de l'aneurine et des polyphosphates de sodium

Nous avons précédemment rapporté<sup>1</sup> comment nous avions été amenés à synthétiser des esters amides polyphosphoriques de l'aneurine (E.A.P.P.) qui se distinguaient chimiquement de l'ester pyrophosphorique de LOHMAN et SCHUSTER<sup>2</sup> et de l'ester triphosphorique de KARRER et VISCONTINI<sup>3</sup> par la présence de deux chaînes polyphosphoriques de longueur variable fixées l'une par liaison d'ester sur l'alcool primaire du noyau thiazol, l'autre par liaison d'amide sur l'arylamine du noyau pyrimidique (Formula).

Nous pensions dès lors que le nombre élevé et d'ailleurs variable d'atomes de phosphore portés par la molécule d'aneurine pouvait lui conférer des propriétés biochimiques nouvelles.

Nous avons d'abord étudié l'activité cocarboxylase de ces corps. Nous exposons ici les résultats que nous avons obtenus.

<sup>1</sup> H. ROUX, Y. TEYSSEIRE et G. DUCHESNE, Bull. Soc. Chim. biol. 30, 592 (1948).

<sup>2</sup> K. LOHMANN et P. SCHUSTER, Biochem. Z. 294, 188 (1937).

<sup>3</sup> P. KARRER et M. VISCONTINI, *Helv. chim. acta* **29**, 711 (1946). — M. VISCONTINI, G. BONETTI et P. KARRER, *ibid.* **32**, 1478 (1949).

Nous phosphorylons l'aneurine conformément à notre technique<sup>1</sup>. Nous effectuons un premier fractionnement grossier du produit brut de phosphorylation par précipitation acétonique (liqueur totale). Nous séparons ensuite de cette fraction les seuls E.A.P.P. par précipitation avec le sel de Roussin<sup>2</sup>. Nous isolons enfin de la solution obtenue les E.A.P.P. les plus chargés en phosphore par précipitations fractionnées acétoniques (esters purifiés). La molécule d'aneurine dans les différentes solutions est dosée par la méthode spectrophotométrique de ROUX<sup>3</sup>; le phosphore est dosé par la méthode de BERENBLUM et CHAIN<sup>4</sup> après hydrolyse (phosphore hydrolysable) ou minéralisation (phosphore total). L'activité cocarboxylasique est déterminée au moyen de la méthode classique décrite par LOHMANN et SCHUSTER<sup>5</sup>.

Nous comparons l'activité de nos corps à celle de la cocarboxylase pure synthétisée par notre méthode<sup>1</sup>. Nous devons à l'obligeance de M. le Pr. VISCONTINI de l'Institut de chimie de l'Université de Zurich un échantillon de phosphate de cocarboxylase pur qui nous a permis d'établir que notre propre cocarboxylase présentait une activité égale à celle synthétisée par KARRER et VISCONTINI<sup>6</sup>.

Les différents résultats que nous avons obtenus sont rapportés dans le tableau I.

Tableau I

Tabelle 1

Activité cocarboxylasique des E.A.P.P. de l'ancurine en fonction du nombre d'atomes de phosphore total (P.T.) et facilement hydrolysable (P.H.) fixé sur la molécule.

Esters de l'aneurine	mm <sup>3</sup> de CO <sub>2</sub> dégagés en 20 min. par		
	10 µg	30 µg	100 µg
exprimés en aneurine			
Cocarboxylase { P.H. = 1 P.T. = 2 }	76	270	290
E.A.P.P. { P.H. = 2 P.T. = 4 }	45	145	175
	42	128	185
E.A.P.P. { P.H. = 3 P.T. = 5 }	65	90	137
	67	130	185
E.A.P.P. { P.H. = 5 P.T. = 7 }	—	24	96
	—	75	145

<sup>1</sup> H. ROUX, Y. TEYSSEIRE et G. DUCHESNE, Bull. Soc. Chim. biol. 30, 592 (1948).

<sup>2</sup> H. ROUX, D. TEYSSEIRE et G. DUCHESNE, Bull. Soc. Chim. biol. 30, 600 (1948).

<sup>3</sup> H. Roux, Bull. Soc. Chim. biol. 24, 1209 (1942).

<sup>4</sup> J. BERENBLUM et E. CHAIN, Biochem. J., 32, 295 (1938).

<sup>5</sup> K. LOHMAN et P. SCHUSTER, Biochem. Z., 294, 188 (1937).

<sup>6</sup> P. KARRER et M. VISCONTINI. *Hely. chim. acta* 29, 711 (1946).

