

la struttura a globuli irregolari e grossolani, di dimensioni superiori a quelle dell'actina G estratta da conigli normali.

5° La stessa actina trattata con KCl e con LiCl denuncia, in armonia con la constatazione della mancata birifrangenza di flusso¹, una quota molto elevata e talora (negli stadi avanzati della distrofia) esclusiva di aggregati globulari (del tipo actina G). Quando sono presenti forme filamentose, queste sono caratterizzate da una notevole brevità e da una spiccata o totale difficoltà di appaiamento.

Le presenti osservazioni permettono di concludere che negli stadi avanzati della distrofia muscolare da avitaminosi E del coniglio l'actina subisce alterazioni tali da difficoltarne o addirittura annullarne la capacità di aggregazione lineare e laterale, qualora venga trattata con KCl o con LiCl.

Desideriamo esprimere il nostro vivo ringraziamento al Prof. MAROTTA, Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità, per l'ospitalità concessaci. Al Prof. TRABACCHI ed ai suoi Collaboratori vada, in particolare, l'espressione della nostra riconoscenza per l'assistenza tecnica prestataci.

M. ALOISI, A. ASCENZI e E. BONETTI

Dal Centro per lo Studio della Fisiopatologia del Consiglio nazionale delle Ricerche, presso l'Istituto di Patologia generale, Università di Roma, e dall'Istituto di Anatomia patologica, Università di Roma, Marzo 3, 1952.

Summary

Actin F from normal muscles is seen under the electron microscope as single filaments which tend to aggregate in couples side by side. These single filaments are themselves built up of a linear series of minute globular elements lying end to end.

In muscular dystrophy of E avitaminosis, the capacity for linear association of actin globules, and particularly the side-by-side aggregation of single filaments, is markedly impaired or suppressed.

¹ M. ALOISI, A. ASCENZI e E. BONETTI, *Biochim. biophys. Acta* (in stampa).

Modifications de l'action antithyroïdienne de l'extrait de thymus chez le cobaye irradié aux rayons X

Dès les premières études de l'action des rayons X sur le thymus, il a été signalé¹ que le thymus irradié semble évoluer en deux temps. Dans les premiers jours après l'irradiation les lymphocytes sont détruits en grand nombre et digérés par des macrophages. Par la suite et pendant assez longtemps, le thymus montre une image très différente. Les pycnoses ont disparu; les mitoses sont particulièrement nombreuses et il y a de très nombreux petits corpuscules de HASSALL jeunes. Cependant, pendant assez longtemps, la régénération de l'organe n'est pas achevée: la limite entre la corticale et la médullaire reste effacée. Ces constatations, faites à la suite de l'irradiation directe et limitée du thymus, ont été retrouvées par BLOOM² à la suite de l'irradiation de l'animal

entier. D'après BLOOM, 40 jours après l'irradiation le thymus du cobaye montre toujours cette image.

Cette même image (limite effacée entre les deux zones, mitoses nombreuses, nombreux petits corpuscules de HASSALL jeunes) a été observée¹ chez le cobaye à la suite d'injections répétées de thyroxine à des doses dépassant la limite supérieure de l'action antithyroïdienne du thymus². On peut donc se demander si, chez l'animal irradié, cette image n'était pas également l'expression d'une baisse de l'efficacité de l'hormone thymique.

Expérience: Cobayes mâles, thymithyréoprives castrés, irradiés à l'aide d'un appareil Siemens-Halske; distance focale 45 cm; distance entre le tube et l'animal 40 cm; tension primaire 160 V; intensité 10 mA; champ 20/24 cm; filtre de 1 mm de cuivre; dose de rayons 100 à 400 r³. Par la suite, à des délais variés les animaux reçoivent des injections de 10 γ de thyroxine pour 100 g de poids vif et de quantités variables d'extrait de thymus de BEZSSONOFF et COMSA². Nous avons déterminé la dose d'extrait qui, injectée simultanément avec 10 γ de thyroxine à 4 cobayes thymithyréoprives castrés supprime chez tous les quatre l'augmentation du taux d'excrétion de créatine entre 24 et 48 h après l'injection. Les résultats sont résumés dans le tableau.

Quantités suffisantes d'extrait de thymus (BC 31) pour supprimer l'effet de 10 γ de thyroxine sur la créatinurie des cobayes thymithyréoprives castrés traités aux rayons X

Jours écoulés depuis l'irradiation	Dose efficace d'extrait de thymus (unités-cobaye par 100 g de poids vif) après:				
	200 r	250 r	300 r	350 r	400 r
2	70	100	130	155	200
7	40	53	70	82	110
9	—	—	54	—	—
12	22	28	33	39	60
14	—	—	23	—	—
16	12	12	—	14	26
17	—	—	12	—	—
18	10	—	—	—	16
20	10	10	10	10	—
22	—	—	—	—	10

Il résulte de ce tableau que l'exposition aux rayons X augmente notablement la dose d'extrait de thymus nécessaire pour supprimer l'effet d'une quantité donnée de thyroxine (en d'autres termes, elle diminue l'efficacité de l'extrait). Cet effet diminue avec le temps et disparaît en une vingtaine de jours environ. Pendant ces 20 jours, la diminution de l'effet des rayons X suit une courbe continue.

En exprimant la dose de rayons X en unités de 50 r⁴, on peut proposer la formule empirique suivante pour cette variation:

$$0,1 (r - 2) t^2 - 3,8 (r - 2) t + 37 (r - 2) + 10 = X_t,$$

où r est la dose de rayons X (en unités de 50 r);

t le temps en jours;

X_t la dose de thymus suffisante pour annuler 10 γ de thyroxine chez des cobayes irradiés depuis t jours.

Cette formule postule que la dose de 100 r (soit 2 unités de 50 r) n'a pas d'effet sur l'efficacité de l'extrait de

¹ H. RUDBERG, *Arch. Anat. Physiol. Anat. Abt., supp.* 1907, 123. — C. AUBERTIN et E. BORDET, *C. r. Soc. Biol.* 66, 1091 (1909). — C. REGAUD et C. CREMIEUX, *C. r. Soc. Biol.* 72, 253 (1912).

² W. BLOOM, *Histopathology of irradiation* (McGraw-Hill Co., New York 1948).

¹ J. COMSA, *Ann. Endocrin.* 12, 230 (1951).

² J. COMSA, *C. r. Acad. Sci.* 228, 2061 (1949); *Amer. J. Physiol.* 166, 550 (1951).

³ Ceci uniquement pour faciliter les calculs, en évitant les fractions et les rangées trop longues de zéros.

⁴ Ceci uniquement pour faciliter les calculs, en évitant les fractions et les rangées trop longues de zéros.

thymus. La vérification expérimentale de cette assertion a montré en effet que l'action de 100 r dans ces conditions n'est pas mesurable à l'aide de notre épreuve. Dans le lot des cobayes qui ont reçu 100 r, la moitié environ a réagi aux injections simultanées de thyroxine et de thymus comme avant l'irradiation (10 unités-cobaye annulent 10 γ de thyroxine); chez les autres, la dose suffisante de thymus augmente dans une mesure très différente d'un animal à l'autre. Il en résulte une dispersion telle des résultats individuels qu'une mesure satisfaisante est impossible. Ceci nous semble justifier l'assertion que la dose de 100 r est très proche du seuil d'action des rayons X dans notre épreuve.

Entre 200 et 400 r, les résultats calculés à l'aide de la formule proposée plus haut se sont rangés à 104,5 $\pm$ 10,7 % des résultats expérimentaux.

Nous tenons à remercier une fois de plus le Dr CH. M. GROS, professeur agrégé, qui dirige le centre régional anticancéreux de Strasbourg et qui nous a accordé son hospitalité pour ce travail.

J. COMSA

Clinique infantile de l'Université de Strasbourg et Centre régional anticancéreux de Strasbourg, le 16 avril 1952.

Summary

(1) The classical knowledge of the morphological changes determined by the X-rays in the thymus permitted the supposition that X-ray treatment might result in a decreased efficiency of the thymus hormone.

(2) An attempt was made to prove this assumption by measuring the antithyroid potency of the thymus extract of BEZSONOFF and COMSA.

(3) These measurements have shown that the antithyroid potency of this extract decreased notably in X-ray-treated guinea pigs. This effect of the X-rays decreases in a second-degree function of the time elapsing after irradiation and becomes non-measurable within about 20 days.

Enhancement of Colour Intensity in the Histochemical Feulgen Reaction: Method and Quantitative Estimation

The colour intensity of the Feulgen reaction performed in test-tube with a solution of D.N.A. is much dependent on the acidity and the concentration of sulfurous acid of the medium¹. Thus, optimal pH for the colour development is around pH 2.3², and addition of acids to the coloured solution accelerates the decomposition of pigment once formed³; increased concentration of metabisulfite further enhances the development of the Feulgen colour⁴.

¹ G. WIDSTRÖM, Biochem. Z. 199, 298 (1928). – T. CASPERSSON, Biochem. Z. 253, 97 (1932). – J. O. ELY and M. H. ROSS, Anat. Rec. 104, 103 (1949). – H. NAORA, H. MATSUDA, M. FUKUDA, and A. SIBATANI, J. Jap. Chem. 5, 729 (1951) (in Japanese).

² T. CASPERSSON, Biochem. Z. 253, 97 (1932). – H. NAORA, H. MATSUDA, M. FUKUDA, and A. SIBATANI, J. Jap. Chem. 5, 729 (1951) (in Japanese).

³ G. WIDSTRÖM, Biochem. Z. 199, 298 (1928).

⁴ J. O. ELY and M. H. ROSS, Anat. Rec. 104, 103 (1949). – H. NAORA, H. MATSUDA, M. FUKUDA, and A. SIBATANI, J. Jap. Chem. 5, 729 (1951) (in Japanese).

Meanwhile, in the Feulgen reaction conducted *in situ*, excess of the Schiff reagent or leucofuchsin must be removed from the coloured tissue preparations without causing regeneration of the native fuchsin dyestuff which otherwise may give rise to an extraneous staining. FEULGEN and ROSSENBECK¹, the originators of the histochemical Feulgen reaction, employed for this purpose a rinsing solution prepared by adding 10 ml of 10 % sodium bisulfite (or metabisulfite) and 10 ml of NHCl to 200 ml water, and this has invariably been followed by subsequent workers essentially without modification² except HERTZ³ who has used 45 % acetic acid for this purpose. However, a rinsing solution of such a composition is remarkably acidic (about 0.05 NHCl) and its sulfurous acid content is suboptimal for the colour development. Accordingly, it is reasonably suspected that a more intense coloration of the Feulgen stain might be realized if a solution for an optimal Feulgen colour-reaction were used for rinsing.

We tested this possibility by comparing colour intensities of Feulgen-stained preparations which had been rinsed with either of the two solutions: (A) the rinsing solution now commonly in use² (for the composition, see above); (B) a mixture of 9 volumes Sørensen's 0.1 N glycine buffer of pH 2.28 and 1 volume 15 % sodium metabisulfite. The composition of the latter solution is similar to that of the medium established by SIBATANI⁴ for the Feulgen reaction *in vitro*. From this experiment it appeared likely by a visual inspection that rinsing with solution B effected more intense coloration than solution A. Repeated experiments gave consistent results.

Then, the amount of the Feulgen pigment produced in cell nuclei was estimated with several rat tissues fixed with 50 % formalin. This was done in order to obtain decisive evidence for the augmentation of the colour intensity, and also to answer the question whether proportions of the colour enhancements with solution B are of the same order for cell nuclei of different types. This was done through microspectrophotometric measurements using the apparatus of the Koana-Naora system⁵. As shown in the accompanying table, the values indicating the amounts of the pigment produced in the individual nuclei are decidedly higher with solution B for three cell types tested. Moreover, the degree of the colour augmentation is fairly constant among these cells, which are distinct from each other in the total amount of the pigment produced within a single nucleus under given conditions of rinsing.

Recently, we have worked out a method which allows to estimate chemically the relative concentration of fuchsin to D.N.A. in Feulgen-stained nuclei⁶. With rat liver nuclei isolated in citric acid and fixed with 20 % formalin, determinations were made for each of the two rinsing solutions indicated above. It should be noted from the data presented in the table that the degree of the increment in the colour intensity as estimated by the chemical method falls within the range of variation of the corresponding values obtained with nuclei of different cell types through microspectrophotometry.

¹ R. FEULGEN and H. ROSSENBECK, Z. Physiol. Chem. 135, 203 (1924).

² R. F. STOWELL, Stain Technol. 20, 45 (1945).

³ E. HEITZ, Ber. dtsh. bot. Ges. 53, 870 (1936). – M. A. LESSLER, Arch. Biochem. Biophys. 32, 42 (1951).

⁴ A. SIBATANI (to be published).

⁵ H. NAORA, Science 114, 279 (1951).

⁶ A. SIBATANI and H. NAORA (to be published).