

We express our gratitude to Miss HELEN BULASCHENKO for technical assistance.

M. ZACCO¹, E. M. RICHARDSON,
J. O. CRITTENDEN, F. C. DOHAN,
and J. L. HOLLANDER

Arthritis Section Department of Medicine and Endocrine Section of the Pepper Laboratory of Clinical Medicine, University Hospital of Pennsylvania, Philadelphia, March 19, 1955.

Riassunto

In pazienti affetti da artrite reumatoide viene iniettato cortisone acetato, idrocortisone acetato, o idrocortisone, nel cavo sinoviale artritico.

La durata del riassorbimento di questi 17-idrossi-corticoidi; la loro distribuzione nelle cellule e nel fluido articolare e nelle cellule del rivestimento sinoviale; le andamento del processo idrolitico dei composti acetati, studiati con mezzi chimici e cromatografici, si prestano a commenti utili ad interpretare la maggiore efficacia locale dell'idrocortisone.

¹ Post-Doctorate Research Fellow, United States Public Health Service. (Permanent address: Istituto di Clinica Medica, University of Bari, Italy.)

Flavines in Experimental Diabetes

It is known that in diabetes (alloxan diabetes in animals, and spontaneous diabetes mellitus in man), a decrease of co-carboxylase content of tissue¹ occurs, due to a disturbance of thiamine phosphorylation².

No study has so far been undertaken to provide information about the behaviour of some of the other coenzymes in diabetic conditions, probably owing to the difficulty of carrying out their routine determination in the tissue.

¹ D. SILIPRANDI and N. SILIPRANDI, *Nature* **168**, 422 (1951).

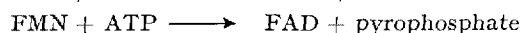
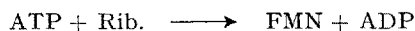
² D. SILIPRANDI and N. SILIPRANDI, *Nature* **169**, 329 (1952). – N. SILIPRANDI and F. NAVAZIO, *Acta Med. Scand.* **142**, 147 (1952).

Using the very handy method recently developed by BESSEY *et al.*¹ for the determination of riboflavin and its coenzymes in tissues, we have investigated the behaviour of these cofactors in alloxan diabetes and comparatively in normal rats. In a number of experiments, FAD has also been determined enzymatically according to the method of WARBURG and CHRISTIAN.²

The results reported in the table show that in diabetic liver a significant decrease of FAD and a corresponding increase of the fraction "FMN + Rib" occurs. In animals with diabetic coma both total flavines and FAD values strongly decrease in respect to normal animals, while the fraction "FMN + Rib" increases.

The administration of riboflavin does not appreciably change the FAD content, either in normal or in diabetic animals; only "FMN + Rib" fraction is augmented. When riboflavin is injected together with ATP, FAD increases significantly mostly in diabetic livers. An analogous effect is noticeable after administration of FMN and of FMN + ATP.

The low content of FAD of diabetic animals is therefore restored to normal values when riboflavin + ATP or FMN are administered. The occurrence in biological materials of the two following reactions:



discovered by KEARNEY *et al.*³ and by KORNBERG *et al.*⁴ respectively in yeast and in liver extracts, indicates that ATP is essential for the synthesis both of FMN and FAD.

In our experiments, the administration of riboflavin to the diabetic animals is as effective as FMN in restoring FAD to the normal values, provided that ATP is also injected. This is evidence that ATP, as indicated by these two reactions, is necessary for the synthesis of FAD *in vivo*, and that most probably both these reactions take place in the living organism.

Since ATP has been found deficient in diabetic liver⁵, the diminution of FAD observed in diabetic animals, may be attributed to this deficiency.

¹ O. A. BESSEY, O. H. LOWRY, and R. H. LOVE, *J. Biol. Chem.* **180**, 755 (1949).

² O. WARBURG and W. CHRISTIAN, *Bioch. Z.* **296**, 294 (1938).

³ E. B. KEARNEY and S. ENGLAND, *J. Biol. Chem.* **193**, 821 (1951).

⁴ A. KORNBERG and W. E. PRICER, *J. Biol. Chem.* **182**, 763 (1950).

– A. W. SCHRECKER and A. KORNBERG, *J. Biol. Chem.* **182**, 795 (1950).

⁵ N. O. KAPLAN and D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.* **156**, 525 (1944). – E. CUTOLO and N. SILIPRANDI, *Exper.* **8**, 24 (1952).

Flavines $\mu\text{g/g}$ of fresh liver tissue

Treatment or condition	Normal rats				Diabetic rats			
	N° of experiments	Total flavines	FAD	FMN + Rib.	N° of experiments	Total flavines	FAD	FMN + Rib.
	18	33.93 \pm 4.11	29.33 \pm 3.41 (27.75 \pm 3.05)	4.60 \pm 0.51	19	27.87 \pm 3.01	21.40 \pm 3.01 (19.80 \pm 2.60)	6.47 \pm 0.7
					(^o) 8	19.83 \pm 2.04	11.50 \pm 1.51 (11.10 \pm 1.30)	8.33 \pm 1.10
Rib.(1)	11	39.22 \pm 4.80	31.75 \pm 3.60	4.47 \pm 1.90	10	31.47 \pm 3.50	20.92 \pm 2.70	10.55 \pm 1.40
Rib.+ ATP(2)	12	39.95 \pm 4.20	32.45 \pm 3.45	7.50 \pm 1.65	9	34.45 \pm 3.70	27.40 \pm 3.10	7.05 \pm 1.10
FMN(3)	15	38.02 \pm 3.75	33.74 \pm 3.65	4.28 \pm 1.15	14	34.25 \pm 3.20	28.55 \pm 3.45	5.70 \pm 0.85
FMN+ATP(4)	10	39.05 \pm 4.20	34.80 \pm 3.70	4.25 \pm 1.20	10	33.65 \pm 3.30	29.00 \pm 3.55	4.65 \pm 1.05

The values represent the means \pm the standard error of the means. The substances were injected to the animals intraperitoneally in the following amounts: (1) Rib. 0.5 mg; (2) Rib. 0.5 mg + ATP.Na 1 mg; (3) FMN 0.6 mg; (4) FMN 0.6 mg + ATP.Na 1 mg. (^o) In these experiments rats were in diabetic coma. () FAD determined enzymatically according to WARBURG and CHRISTIAN (5).

The following abbreviations are used:

FAD = flavinadenin dinucleotide
 FMN = flavinmononucleotide
 Rib. = riboflavin
 ATP = adenosintriphosphate

F. NAVAZIO and N. SILIPRANDI

*Institute of Biological Chemistry, University of Rome,
 February 18, 1955.*

Riassunto

Gli autori hanno determinato il FAD e la frazione FMN + Rib. nel fegato di ratti normali e diabetici da allossana. Il FAD è stato trovato diminuito in modo significativo nei diabetici. Somministrando riboflavina + ATP si ottiene un aumento dei valori del FAD. Questi valori restano quasi immutati somministrando riboflavina da sola.

PRO LABORATORIO

Zur Mikroabsorptionsspektralanalyse im sichtbaren Spektralgebiet und im UV¹

Die Mikroabsorptionsspektralanalyse, insbesondere im UV, ist in den letzten Jahren wesentlich von CASPERSSON² zu einem wichtigen experimentellen Hilfsmittel für biologische und biochemische Fragestellungen entwickelt worden. Die bisher üblichen Geräte zur Mikroabsorptionsspektralanalyse haben sich aus dem Mikroskop entwickelt, wobei entweder die gewöhnliche Mikroskopierlampe durch einen Monochromator ersetzt oder ein von einem Mikroskopobjektiv entworfenes Bild des Objektes auf einen Spektrometerspalt geworfen wird (vgl. zum Beispiel 2). Entsprechend der mikroskopischen Praxis wird hierbei das Objektfeld meist nach den Prinzipien des Köhlerschen Strahlenganges ausgeleuchtet. In neuerer Zeit werden Spiegelobjektive zur Mikroabsorptionsspektralanalyse herangezogen³, welche durch ihre Achromasie die Einstellung und Justierung der Mikrospektrometer erleichtern.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Verwendung von Quarzobjektiven in einer an sich bekannten optischen Anordnung gewisse Vorzüge bietet, die gerade durch die sonst ungünstig beurteilte Nichtachromasie dieser Objektive bedingt sind. Wir haben dabei die von v. ROHR berechneten Zeiss-Objektive mit den Aperturen 0,2, 0,35 und 0,85 (Glyzerinimmersion) verwendet. Bekanntlich ist in einem Gerät zur Spektralanalyse der messbare Extinktionsbereich durch den Anteil an «falschem Licht» begrenzt: an Prismenfassungen, Blenden und Gehäuse gestreutes Licht fremder Wellenlängen gelangt zur Photometriereinrichtung und lässt die Extinktion zu niedrig erscheinen. Bei Geräten zur mikroskopischen Spektralanalyse mit Köhlerscher Beleuchtung tritt noch eine zusätzliche, andersartige Erniedrigung des Messbereiches auf:

Das mikroskopische Objekt liegt in einem gleichmässig ausgeleuchteten Gesichtsfeld. Es kann daher

Strahlung neben dem zu untersuchenden Objekt im Objektiv gestreut werden und so das Messergebnis verfälschen. Der letztere Fehler ist zu beseitigen, wenn man statt der Köhlerschen Beleuchtungsanordnung (für mikroskopische Beobachtung grösserer Flächen gedacht) eine Lichtsonde ähnlich wie im Mikroskopphotometer zur Beleuchtung des interessierenden Objektes wählt, die durch ein Mikroskopobjektiv gebildet werden kann, welches den Monochromatorspalt direkt im Objekt abbildet. Zum Erzielen einer guten Abbildung muss sich der Monochromatorspalt in ungefähr der normalen Tubuslänge von diesem Objektiv entfernt befinden. Gleichzeitig hat man den Vorteil, mit relativ engen Blenden (also spektralreinem Licht) und einem Monochromator kleiner Öffnung trotz guter Intensitätsausbeute arbeiten zu können, da der Monochromator nur noch ein kleines Flächenelement und nicht das gesamte Gesichtsfeld intensiv ausleuchten muss. Ein weiterer wesentlicher Vorteil wird durch die Beseitigung anisotroper Beleuchtungsapertur einer Köhlerschen Anordnung mit Monochromator gewonnen, auf deren störenden Einfluss insbesondere bei Messungen im polarisierten Licht LÜTHY¹ hinwies und die auf der Wirkung des Monochromatorspaltes als Aperturblende beruht. Als Beleuchtungsapertur verwenden wir die Objektivapertur, welche durch geeignete Wahl des Beleuchtungsobjektes beliebig einstellbar ist.

Ferner konnten wir zeigen, dass auch der Einfluss von spektralunreinem Licht weitgehend auszuschalten ist, wenn nichtachromatische Mikroskopobjektive zur Beleuchtung und zur Abbildung verwendet werden. Durch eine Blende in der Okularebene ist das Bild des Monochromatorspaltes oder einer an seiner Stelle befindlichen Blende das Bild des zu untersuchenden Objektes gleichzeitig auszublenden. Die Kombination Beleuchtungs- und Abbildungsobjektiv mit Monochromator- und Okularblende wirkt dann als Linsenmonochromator, wobei diese Monochromatisierung bei geeigneter Wahl von Objektiven und Blenden für Übersichtsmessungen sogar den vorgesetzten Monochromator entbehrlich macht. Mit diesem erhält man Ergebnisse, die sonst nur mit dem Doppelmonochromator erzielt werden könnten. Bei einfacherem Aufbau wird die Nachmonochromatisierung ohne Intensitätseinbusse erzielt, und es sind keine zusätzlichen brechenden, beugenden oder spiegelnden Flächen erforderlich.

Für gute Monochromatorwirkung sollte das Bild der Monochromatorblende und der Okularblende möglichst gleich gross sein; was allerdings eine sehr sorgfältige Justierung der optischen Anordnung in die optische Achse bedingt, für die wir (ebenso wie für die Aufnahme der Fokuskurven der Objektive) ein lichtelektrisches Einstellverfahren verwendet haben. Mit auf Quarzblättchen aufgedampften Spalttestobjekten von 0,05 mm wird der maximale Lichtdurchlass bei Abbildung des Spalttestobjektes lichtelektrisch bestimmt. Bei geordneten Veränderungen der Justierbedingungen gestattet das Verfahren in sehr sicherer Weise eine Prüfung der Einstellungen und ist dem Einstellverfahren mit Fluoreszenzeinstellung überlegen.

Die Erhöhung des Extinktionsbereiches ist gerade bei Geräten zur Mikrospektralanalyse sehr willkommen. Bei festen mikroskopischen Objekten (zum Beispiel Kristallen) ist der Absorptionskoeffizient häufig so hoch, dass es allgemein Schwierigkeiten bereitet, genügend dünne Objekte zur Untersuchung zu finden. Es sei hier auch auf die an sich bekannte Tatsache hingewiesen, dass Quarzobjektive grundsätzlich für Untersuchung

¹ Mit Unterstützung der Ciba-Stiftung für chemische, medizinische und technische Forschung.

² T. CASPERSSON, Skand. Arch. Physiol. 73, Suppl. 8 (1936).

³ R. C. MELLORS, Discuss. Faraday Soc. Nr. 9, 398 (1950). – K. P. NORRIS und H. F. WILKINS, Discuss. Faraday Soc. Nr. 9, 360 (1950).

¹ H. LÜTHY, Pflüger's Arch. 253, 477 (1951).