

(«aufgelockerte Spinnen», Abb. 1 D). Auch die Chromatophoren der Haut verändern sich charakteristisch.

Das regelmässige Auftreten der oben beschriebenen Veränderungen der Chromatophoren in der Rückenflosse bei steigenden Konzentrationen von LSD 25 erlaubt einen quantitativen Vergleich der diesbezüglichen Wirkung chemisch verwandter Substanzen. Setzt man die Aktivität von D-Lysergsäure-diäthylamidtartrat willkürlich gleich 100, so beträgt diejenige seines linksdrehenden Isomers (L-Lysergsäure-diäthylamidtartrat) etwa 3, die von D-1-Brom-lysergsäure-diäthylamidbitartrat rund 250 und die von Methyl-ergobasintartrat (Methergin) etwa 0,8.

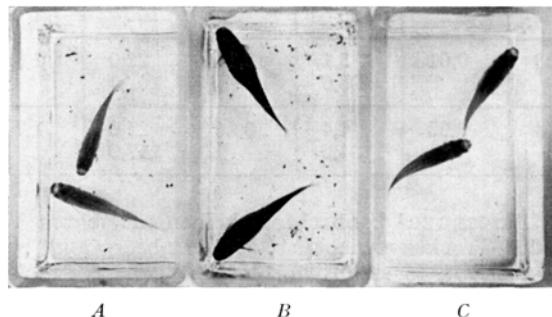


Abb. 2. *Poecilia reticulatus* ♀. A helladaptierte Kontrolltiere; B 25 µg/ml LSD25 während 120 min; C 1000 µg/ml 5-Oxytryptamin 120 min lang, dann zusätzlich 25 µg/ml LSD25 120 min lang.

5-Oxytryptamin-kreatininsulfat, in grossen Dosen prophylaktisch verabreicht, verhindert die Wirkung von LSD 25 auf die Chromatophoren (Abb. 2). Die hierzu nötigen Konzentrationen von 5-Oxytryptamin sind zwar gross (zum Beispiel 500 µg/ml oder 1000 µg/ml), haben aber auf die Farbe der Fische auch bei längerer Einwirkung in der Regel keinen Einfluss. Nur gelegentlich zeigen einige Tiere leichte Dunkelfärbung. Während die Hemmung von 5-Oxytryptamin-Effekten durch LSD 25 in zahlreichen verschiedenen Testen nachgewiesen werden kann, ist der umgekehrte Antagonismus von Serotonin gegenüber LSD 25 wohl schon erörtert, aber bisher noch nicht so eindeutig demonstriert worden, wie das an Hand der Chromatophorenreaktion gelungen ist.

A. CERLETTI und B. BERDE

Pharmakologisches Laboratorium der Sandoz AG. Basel,
den 14. Mai 1955.

Summary

D-lysergic acid diethylamide (LSD 25) has a characteristic effect on the chromatophores of the female fish guppy (*Poecilia reticulatus*). This effect can be prevented by prophylactic administration of 5-hydroxytryptamine (serotonin, enteramine).

Quantitative Untersuchungen über den Nukleinsäureverlust des Gewebes bei Fixierung und Einbettung¹

Die histochemische Untersuchung von Geweben erfordert in den meisten Fällen eine Vorbehandlung (Fixierung, Einbettung), über deren Auswirkung auf die Struktur und die chemische Zusammensetzung der Zellsubstanzen wir bisher nur mangelhaft unterrichtet sind. Für den quantitativen Nachweis bestimmter Zellbestandteile muss neben vielen anderen Voraussetzungen

gefördert werden, dass die Vorbehandlung des Gewebes keinen Verlust der nachzuweisenden Substanz zur Folge hat.

Zur quantitativen histochemischen Erfassung der Nukleinsäuren stehen uns einmal färberische Reaktionen zur Verfügung (Feulgenreaktion für Desoxyribonukleinsäure, Gallozyaninchromalaun für Desoxy- und Ribonukleinsäure SANDRITTER¹, DIEFENBACH²), zum anderen die lichtoptische Methode von CASPERSSEN³. Neben einem Verlust von Nukleinsäuren muss bei beiden Methoden mit anderen Veränderungen (Maskierung reaktiver Gruppen, unspezifische Absorption und anderes) gerechnet werden. Mehrere Autoren (SYLVEN⁴, HARBERS und NEUMANN⁵, SIBATANI und FUKUDA⁶ und andere) haben sich in jüngster Zeit mit dieser Frage beschäftigt und kamen zu widersprechenden Ergebnissen. Unsere eigenen quantitativen ultraviolettmikrospektrographischen Untersuchungen⁷ veranlassten uns, der Frage nach einem möglichen Nukleinsäureverlust durch die Fixation, Einbettung und Nachbehandlung des Gewebes nachzugehen.

Methodik. Die Untersuchungen wurden an der Leber von Kaninchen durchgeführt. Zur quantitativen chemischen Bestimmung der Nukleinsäuren verwendeten wir mehrere Methoden gleichzeitig nebeneinander. Der Gehalt an Desoxyribonukleinsäurephosphor (DNSP.) und Ribonukleinsäurephosphor (RNSP.) wurde nach SCHMIDT und TANNHAUSER und OGUR und ROSEN bestimmt, außerdem wurden die Perchlorsäureextrakte des Gewebes bei 260 mµ Wellenlänge im Beckmann-Photometer gemessen. Alle Methoden ergaben eine gute Übereinstimmung, obwohl bei der Schmidt-Tannhauser-Methode die Variationsbreite der Ergebnisse grösser war als bei der Methode nach OGUR und ROSEN. Als Ausgangswerte dienten die Ergebnisse der Nukleinsäurebestimmungen des Frischgewebes (2 cm³ Material). Das Gewebe wurde in Formalin (Verdünnung 1:10) fixiert (24 h Zimmertemperatur) oder in Carnoyscher Lösung (2 h Zimmertemperatur). Ein Teil des fixierten Gewebes wurde unter den üblichen Bedingungen (70, 96 % Alkohol, Azeton, Xylol) in Paraffin eingebettet, *in toto* entparaffiniert (Xylol, 96, 70 % Alkohol, Aqua dest.) und zur Bestimmung der Nukleinsäuren homogenisiert. Der andere Teil des Gewebes wurde ohne Einbettung unmittelbar nach der Fixation verarbeitet. Zur Kontrolle wurden die Fixierungsmittel und die zur Nachbehandlung angewandten Flüssigkeiten konzentriert und papierchromatographisch auf ihren Nukleinsäure- und Eisweisskörpergehalt untersucht (Kontaktphotographie im UV-Licht, Ninhydrin-Amidoschwarz- und Gallozyaninchromalaunfärbung). Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet und die Signifikanz durch Fehlerrechnung gesichert.

Ergebnisse. Die Tabelle zeigt den Nukleinsäure-Phosphorgehalt verschieden vorbehandelten Gewebes in mg P und den Nukleinsäuregehalt nach Umrechnung aus den Extinktionswerten bei 260 mµ Wellenlänge.

¹ W. SANDRITTER, M., DIEFENBACH und F. KRANTZ, Exper. 10, 210, (1954).

² H. DIEFENBACH und W. SANDRITTER, Acta Histochem. 1, 55 (1954).

³ T. O. CASPERSSEN, *Cell Growth and Cell Function* (W. W. Norton, New York 1951).

⁴ B. SYLVEN, Extrait de Acta Union Internationale contre le Cancer 7, 700 (1951); *Freezing and Drying* (published by the Institute of Biology London 1951, S. 169).

⁵ E. HARBERS und K. NEUMANN, Z. Naturforschg. (im Druck).

⁶ A. SIBATANI und M. FUKUDA, Biochim. Biophys. Acta 10, 93 (1953).

⁷ W. SANDRITTER, Frankfurter Z. Path. 64, 520 (1953).

¹ Ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Art der Vorbehandlung	$A = \text{Analysenwert}$ $B = \% \text{ des Frischgewebes}$	Zahl	mg P in 2 cm ³ Gewebe				mg NS in 2 cm ³ Gewebe (UV.)			
			DNS.	σ	RNS.	σ	DNS.	σ	RNS.	σ
1. Frischgewebe . . .	A B	10	0,373 100	0,0097	0,697 100	0,006	3,7 100	0,21	17,9 100	0,96
2. Formalinfixation .	A B	10	0,374 100,2	0,013	0,675 96,8	0,008	4,3 116,2	0,30	15,8 88,2	1,02
3. Carnoy-Fixation .	A B	10	0,315 84,4	0,0136	0,695 99,6	0,003	4,5 121,6	0,32	17,4 97,2	0,20
4. Frischgewebe . . .	A B	10	0,613 100	0,004	1,10 100	0,02	5,2 100	0,3	21,2 100	0,97
5. Formalinfixation, Paraffineinbettung	A B	10	0,607 99,0	0,007	1,09 99,9	0,01	5,1 98,0	0,14	22,0 103,7	1,32
6. Carnoy-Fixation, Paraffineinbettung	A B	10	0,620 101,1	0,008	1,14 103,6	0,03	4,4 84,6	0,26	25,0 117,9	1,79

Hierbei wurde als Eichkurve eine 9,3% Phosphor enthaltende DNS-Lösung verwendet mit einer Extinktion von 0,905 (0,005%ige Lösung). Die Tabelle zeigt, dass die Vorbehandlung des Gewebes (Fixierung, Einbettung und Nachbehandlung) nicht zu einem messbaren Nukleinsäureverlust führt. Die Ergebnisse sind statistisch gesichert. Die höheren Nukleinsäure-Phosphor-Werte unter Nr. 4-6 der Tabelle sind damit zu erklären, dass in diesen Versuchen die Leber eines jüngeren Tieres verwendet wurde. Ausschlaggebend ist hier die Übereinstimmung der Werte des Frischgewebes mit dem vorbehandelten Gewebe.

Die papierchromatographischen Untersuchungen der Fixierungsmittel und der bei der Einbettung und Nachbehandlung angewandten Flüssigkeiten zeigen, dass keine Nukleinsäure in Lösung gegangen ist (Färbung mit Gallozyaninchromalaun). Dagegen konnten in den Fixierungsflüssigkeiten (Carnoy und Formalin) und in dem bei der Einbettung benutzten 70%igen Alkohol Spuren von Eiweiss und Aminosäuren (Polypeptide) nachgewiesen werden (Kontaktphotographie, Färbung mit Amidoschwarz und Ninhydrin).

Diskussion. Im Gegensatz zu anderen Untersuchern fanden wir bei der Vorbehandlung von Lebergewebe keinen Verlust an Nukleinsäure. SYLVEN berichtet über einen beträchtlichen Masseverlust des Gewebes nach Fixierung mit Formalin, Carnoy und absolutem Alkohol (24 h Zimmertemperatur), der auf eine Lösung von Fetten, Eiweisskörpern und Nukleinsäuren zurückzuführen sei. Auch HARBERS und NEUMANN finden bei Carnoy-Fixation bei Zimmertemperatur einen zunehmend stärkeren RNS.-Verlust des Gewebes bis zu 60% (in Abhängigkeit von der Fixationsdauer), während bei der Fixation in der Kälte (4°) keine Nukleinsäure in Lösung geht. Diese Untersuchungen zeigen, dass bei säurehaltigen Fixierungsmitteln bei längerer Einwirkung und höherer Temperatur RNS. leicht in Lösung geht. Dieser Befund wird verständlich, wenn man bedenkt, dass mit verschiedenen Säuren (HClO_4 , HCl und anderen) und schon mit heißem Wasser die RNS. leicht hydrolysiert werden kann und diese Substanzen teilweise als Ersatz für die Ribonuklease angewendet werden. Die DNS scheint dagegen wesentlich stabiler zu sein.

Bei der Fixation mit Formalin (50%ig, 20%igem Formalin und Alkoholformalin 9:1) fanden SIBATANI und FUKUDA übereinstimmend mit unseren Untersuchungen keinen Nukleinsäureverlust des Gewebes.

Auch MOBERGER¹ beobachtete keinen messbaren Verlust des Trockengewichtes (Röntgenabsorption) beim Vergleich von formalinfixiertem und gefriergetrocknetem Material. KAUFMANN² et al. sehen eine geringe Lösung von Proteinen nach Carnoy-Fixation. Bei der Fixation mit Formalin und Carnoyscher Flüssigkeit hat man demnach mit einem geringen Proteinverlust des Gewebes zu rechnen. Man muss aber hierbei in Rechnung setzen, dass diese geringen Proteinmengen auch aus dem Blutplasma oder den Erythrozyten stammen können.

Weitere Untersuchungen an gefriergetrocknetem Material sind im Gange.

W. SANDRITTER und J. HARTLEIB

Senckenbergisches Pathologisches Institut der Universität Frankfurt am Main, den 14. April 1955.

Summary

Quantitative chemical determination of nucleic acid shows that no loss of nucleic acid occurs on fixation with formalin and CARNOY's solution (24 or 2 h at room temperature) and after dehydration and embedding of the tissues. Small amounts of protein were shown in the fixative solution.

¹ G. MOBERGER, Acta Radiol. Suppl. Stockholm 1954, 112.

² B. P. KAUFMANN, M. R. McDONALD, H. GAY, K. WILSON, R. WYMAN und N. OKUDA, Carnegie Year Book 47, 144 (1948).

Über

6-(4'-Pyridyl)-3-mercaptop-1,2,4-triazin-5-on

In einer früheren Mitteilung wurde über die Eigenschaften einer Reihe von substituierten Mercapto-triazinonen berichtet¹. Bei der Weiterbearbeitung dieses Gebietes zeigte sich, dass das dort beschriebene 6-(4'-Pyridyl)-3-mercaptop-1,2,4-triazin-5-on nicht einheitlich war, indem bei der Herstellung durch Zersetzung teilweise ein Nebenprodukt entsteht.

¹ R. E. HAGENBACH, E. HODEL und H. GYSIN, Angew. Chemie 66, 359 (1954); vgl. Exper. 10, 62 (1954).