

This is the first time, as far as it is known to the authors, that succinic dehydrogenase has been demonstrated histochemically under conditions in which no mitochondrial bodies are present. It is most remarkable that, in a cell whose cytoplasm has assumed a unique, highly specialized function, the nucleus, which is in a continuous resting phase, displays metabolic activities that are usually associated with the cytoplasm in other tissues.

V. DEFENDI and B. PEARSON

*Detroit Institute of Cancer Research, Detroit 1, Michigan, April 26, 1955.*

#### Zusammenfassung

Dehydrase- und Succinodehydraseaktivität werden mittels histochemischer Methode durch Tetrazoliumsalze in Kernen der Hühnererythrocyten dargestellt. Das Vorhandensein der Formazankristalle beschränkt sich vor allem auf die innere Oberfläche der Kernmembran. Die Bedeutung dieser Entdeckungen im Zusammenhang mit dem Succinodehydrase-Mitochondrien-Verhältnis wird kurz besprochen.

#### Etude histochimique de l'action des rayons X sur les cholinestérasées

On sait depuis longtemps<sup>1</sup> que les globules rouges possèdent de l'acétylcholinestérase (AChE = cholinestérase spécifique ou vraie). Mais ce n'est que depuis les travaux de ZAJIČEK et de ROGISTER<sup>2</sup> qu'on connaît la présence de cet enzyme dans les éléments qui sont à l'origine des cellules sanguines, à savoir les érythroblastes et les mégacaryocytes, et aussi dans les thrombocytes<sup>3</sup>.

Chez l'homme, on trouve cette estérase presque exclusivement dans les érythrocytes, où elle serait localisée sur la membrane<sup>4</sup>, et dans les érythroblastes, tandis que chez le chat, elle se trouve dans le protoplasme des mégacaryocytes et des plaquettes. Chez la souris, animal qui a servi à nos expériences, l'enzyme est peu actif dans la lignée érythrocytaire et fort actif dans la lignée thrombocytaire.

On ignore le rôle de l'AChE dans les éléments sanguins. On suppose qu'elle intervient pour maintenir la perméabilité de la membrane cellulaire, car l'inhibition par la physostigmine provoque une modification de la perméabilité et de l'échange des ions sodium et potassium<sup>5</sup>.

En partant du fait que la perturbation de perméabilité cellulaire est une des premières manifestations du syn-

drome d'irradiation<sup>1</sup>, nous avons cherché à déterminer l'influence des rayons X sur les cholinestérasées des éléments hématopoïétiques et des cellules du sang. Dans ce dernier, l'AChE des hématies échappe à l'analyse histochimique, sans doute à cause de l'état dispersé de l'enzyme dans ces éléments. D'autre part, les plaquettes sont moins favorables à l'étude histochimique que les mégacaryocytes. Nous avons donc examiné l'activité acétylcholinestérasique des mégacaryocytes dans la rate et la moelle osseuse chez des souris de race C3H (mâles de 6 mois). Dans une série d'expériences, nous avons observé aussi l'activité de cet enzyme dans les plaques motrices du muscle strié. Quant à la cholinestérase (ChE = cholinestérase non spécifique ou pseudo-cholinestérase), celle du sérum ne peut être mise en évidence par notre technique, et nous avons dû utiliser des coupes de divers organes (foie, pancréas, prostate) pour définir l'effet de l'irradiation sur cet enzyme.

Les animaux ont été irradiés au moyen d'un appareil «Siemens» (250 kV, 20 mA, 0,5 Cu, champ 15 × 15 cm, intensité 80 r/min) avec contrôle au dosimètre «Siemens». Les doses d'irradiation et les temps de survie accordés aux animaux sont indiqués dans le graphique. Certaines souris ayant reçu 800 ou 600 r ont été laissées en vie plus longtemps: jusqu'à 20 jours après l'irradiation. La dose mortelle pour nos souris est de 750 r.

La détermination d'activité cholinestérasique est faite suivant la méthode de KOELLE modifiée par GEREBTZOFF<sup>2</sup>. Pour chaque organe, les coupes ont été incubées en présence d'acétylthiocoline ou de butyrylthiocoline durant 30 à 120 min. L'estimation d'activité enzymatique se fait d'après l'intensité de la coloration. Elle est, par conséquent, subjective, et ne donne qu'une idée imprécise des variations quantitatives.

L'ensemble des résultats est indiqué dans le graphique.

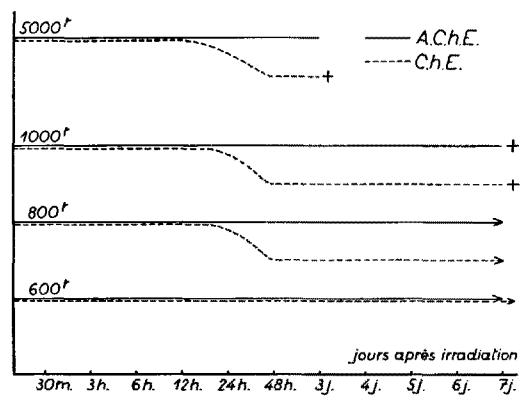


Fig. 1.

L'AChE des mégacaryocytes de la rate et de la moelle osseuse et aussi celle des plaques motrices est très résistante aux rayons X, même à la dose de 5000 r. On n'a pas constaté de diminution de leur activité même quand les mégacaryocytes présentent de grandes altérations dans leur structure cellulaire (vacuolisation et désintégration du noyau). L'activité de l'AChE disparaît en même temps que s'éliminent les débris de mégacaryocytes, c'est-à-dire au bout de 2 jours pour 5000 r, vers le 5<sup>e</sup> jour pour 1000 r, et au-delà d'une semaine pour 800 r. Après une dose de 600 r, les mégacaryocytes et l'activité enzymatique persistent. Quelle que soit la dose,

<sup>1</sup> J. FEGLER, H. KOWARZYK et J. SZPUNAR, Bull. int. Acad. polon. Sci. cl. Méd. 7, 517 (1937). — G. A. ALLES et R. C. HAWES, J. biol. Chem. 133, 375 (1940). — D. RICHTER et P. G. CROFT, Biochem. J. 36, 746 (1942).

<sup>2</sup> J. ZAJIČEK et N. DATTA, Acta Haemat. 9, 115 (1953). — J. ZAJIČEK, B. SYLVE et N. DATTA, J. Histochem. and Cytochem. 2, 115 (1954). — J. ZAJIČEK, Acta Haemat. 12, 238 (1954). — G. ROGISTER, C. r. Soc. Biol. 148, 1900, 1910 (1954).

<sup>3</sup> J. ZAJIČEK et N. DATTA, Acta Haemat. 9, 115 (1953). — J. ZAJIČEK, B. SYLVE et N. DATTA, J. Histochem. and Cytochem. 2, 115 (1954). — J. ZAJIČEK, Acta Haemat. 12, 238 (1954). — G. ROGISTER, C. r. Soc. Biol. 148, 1900, 1910 (1954). — K. B. AUGUSTINSSON, N. DATTA, M. GRAHN et J. ZAJIČEK, Nature 169, 800 (1952). — J. ZAJIČEK et N. DATTA, Acta haemat. 7, 39 (1952).

<sup>4</sup> P. G. CROFT et D. RICHTER, J. Physiol. 102, 155 (1943).

<sup>5</sup> K. B. AUGUSTINSSON in *The enzymes* by J. B. SUMNER and MYRBÄCK, vol. 1 (Academic Press, New-York 1950). — W. C. HOLLAND et M. E. GREIG, Amer. J. Physiol. 162, 610 (1950). — M. E. GREIG et W. C. HOLLAND, Arch. Biochem. 23, 370 (1949).

<sup>1</sup> Z. M. BACQ et P. ALEXANDER, *Principes de Radiobiologie* (Masson, Paris 1955).

<sup>2</sup> M. A. GEREBTZOFF, Acta Anat. 19, 366 (1953).

l'intensité de la réaction histochimique ne diminue pas dans les plaques motrices.

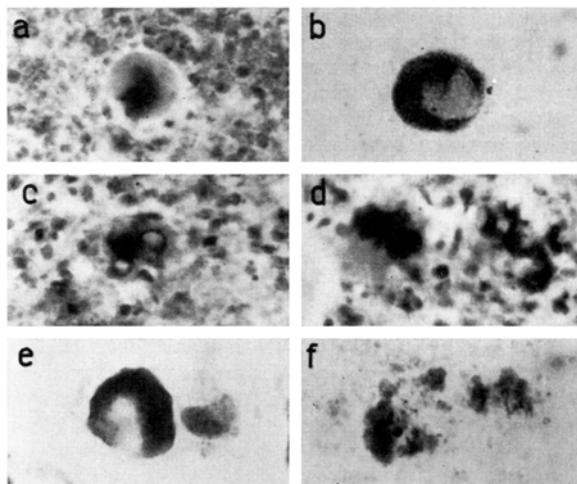


Fig. 2

Mégacaryocytes dans la rate de la souris. *a* normal; coloration à l'hémalun-éosine. *b* normal; AChE. *c* mégacaryocyte vacuolisé 24 h après 5000 r; coloration à l'hémalun-éosine. *d* un mégacaryocyte peu altéré et un autre en désintégration 24 h après 5000 r; même coloration. *e* un mégacaryocyte peu altéré et un autre en voie de disparition 24 h après 5000 r; AChE. *f* deux mégacaryocytes en désintégration 24 h après 5000 r; AChE. Grossissement: 450 x. Incubation en présence d'acétylthiocholine: 90 à 120 min à pH 6,2.

On ne constate pas de diminution de l'activité de la ChE du foie immédiatement après l'irradiation. Cette activité commence à baisser plus tard: vers 12 h après 5000 r; cette chute est plus accentuée vers 24 h et 48 h après les doses de 5000 r, 1000 r et 800 r, comme le montre le graphique. On n'a constaté aucune diminution même 15 ou 20 jours après une dose de 600 r. La ChE du pancréas et de la prostate réagissent de la même façon.

Nos résultats s'accordent avec ceux de CONARD<sup>1</sup> sur la ChE de l'intestin, obtenus en utilisant la technique colorimétrique d'après HESTRIN, et avec ceux de BURN et collaborateurs<sup>2</sup> sur l'AChE et la ChE du foie et de l'intestin, au Warburg. Il est difficile de faire une comparaison avec les travaux de BAGLIONI<sup>3</sup> et de KWIATKOWSKI<sup>4</sup> à cause des différences de conditions expérimentales.

En conclusion, nous pouvons dire que l'AChE des mégacaryocytes de la rate et de la moelle osseuse et aussi celle des plaques motrices est très résistante aux rayons X. On obtient les mêmes résultats pour la ChE du foie, du pancréas et de la prostate, dont l'activité n'est pas diminuée immédiatement après l'irradiation, mais baisse légèrement après 12 h et surtout 48 h pour les doses de 5000 r, 1000 r et 800 r. Il est probable que cela est dû à la diminution des synthèses enzymatiques dans le foie, organe qui souffre profondément à la suite de l'irradiation<sup>5</sup>.

La grande résistance des cholinestérases et surtout de l'AChE au rayonnement X semble indiquer que les modifications de perméabilité des membranes cellulaires

qui conditionnent les radiolésions ne sont pas liées à des modifications de ces enzymes.

S. HAJDUKOVIC

*Laboratoires d'anatomie et de pathologie de l'Université de Liège; Institut «Boris Kidrič» à Vinča-Belgrade, le 9 juin 1955.*

*Summary*

Using a histochemical method, we have observed the cholinesterase activity in mice after X irradiation. Both types of cholinesterases were examined: AChE (specific ChE) of megacaryocytes of spleen and bone marrow, and AChE of motor endplates; and non-specific ChE of liver, pancreas and prostate. There is no inactivation of AChE even after 5000 r. ChE is also very resistant: activity is slowed down only 12 h or even a few days following irradiation and the inactivation remains slight. We suppose that the great alterations in cellular permeability caused by irradiation are not correlated with these enzymes.

**Über eine bakterielle Vorverdauung und eine proteolytische Hauptverdauung im Darm der Nashornkäferlarve (*Oryctes nas.* L.)**

WIEDEMANN<sup>1</sup> hat nachgewiesen, dass sich im Enddarm (Saccusabschnitt) der *Oryctes*larve Zellulose abbauende Bakterien befinden. SCHLOTTKE<sup>2</sup> hat bei anderen im Holz fressenden Käferlarven ein proteolytisches Ferment im Mitteldarm mit einem Wirkungsoptimum bei pH etwa 9,3 gefunden.

Zunächst konnten wir die Feststellungen beider Autoren bei der Larve des Nashornkäfers bestätigen. Die Annahme WIEDEMANNS, ein proteolytisches Ferment werde im sauren Milieu des Saccus aktiviert und über dort eine verdauende Wirkung auf die Zellulose abbauenden Bakterien aus, hat bereits SCHLOTTKE im Zusammenhang mit seinem Mitteldarmferment in Frage gestellt.

Obwohl GOETSCH<sup>3</sup> bei einigen Darmbakterien beherbergenden Insekten durch Einbringen von Darmteilen in Bakterienkulturen eine auflösende Wirkung erzielte, blieb im hier vorliegenden Falle die Frage, ob überhaupt eine Eiweißverdauung über die bakterielle Tätigkeit vorhanden ist, offen. Ferner blieb unklar, wie und wo im positiven Fall die Bakterien unter den Einfluss des proteolytischen Ferments gelangen.

*Einfluss von Mitteldarmextrakt auf Bakterien.* Der Extrakt wurde als Glyzerin-Wasser-Auszug, EK-gefiltert durch Schott G3/G5, auf Kulturen der Darmbakterien in Omelianskylösung zur Einwirkung gebracht. Nach dreitägiger Einwirkung bei 35°C und pH über 7 waren sämtliche Bakterien aufgelöst, während die Kontrollen unverändert blieben. Bei Überimpfung von behandelten und unbehandelten Kulturen auf Agarplatten wurde Koloniewachstum erzielt. Das Ferment hatte offenbar die Sporen in ihrer Keimfähigkeit nicht beeinträchtigt.

*N-Quelle.* Wir stellten fest, dass der N-Gehalt des Futters (Sägemehl) 0,11% beträgt, der N-Gehalt des Nahrungsbreies im Saccus aber das 10fache davon ausmacht. Der N-Gehalt des Kotes liegt mit 0,315% noch wesentlich über dem N-Gehalt des Futters. Auf einen

<sup>1</sup> R. A. CONARD, Amer. J. Physiol. 170, 418 (1952).

<sup>2</sup> J. H. BURN, P. KORDIK et R. H. MOLE, Brit. J. Pharmacol. 7, 58 (1952).

<sup>3</sup> T. BAGLIONI et M. PIEMONTE, Boll. soc. ital. Biol. sper. 23, 732 (1947).

<sup>4</sup> H. KWIATKOWSKI, Fermentforschung 15, 138 (1936).

<sup>5</sup> M. A. GEREBTZOFF et Z. M. BACO, Exper. 10, 341 (1954).

<sup>1</sup> J. F. WIEDEMANN, Morph. Ökol. Tiere 19, 228 (1930).

<sup>2</sup> E. SCHLOTTKE, Zool. Jb. 61, 88 (1945).

<sup>3</sup> W. GOETSCH, Österr. Zool. Z. 1, 58 (1946).