

Hydrogen Peroxide and Heinz Bodies

The idea that haemoglobin was protected by the blood cell catalase against the destructive effect of hydrogen peroxide produced during cell metabolism was suggested by BINGOLD¹. This role of catalase has since been confirmed by several authors². It is claimed also by some authors that there is a protective action of catalase against Heinz body formation³. The causal relationship between catalase inhibition and Heinz body formation has not been proved up to now. It is even questionable whether peroxide can produce Heinz bodies. The aim of this study was to elucidate this problem.

Venous blood of healthy male blood donors was used in the course of our experiments. Blood coagulation was prevented by dried citrate. Experimental methods as follows:

¹ K. BINGOLD, *Klin. Wschr.* 12, 1201 (1933).

² G. BARKAN and O. SCHALES, *Z. physiol. Chem.* 253, 83 (1938). – R. LEMBERG, J. W. LEGGE, and H. W. LOCKWOOD, *Nature* 142, 148 (1938).

³ S. BRENNER and A. C. ALLISON, *Exper.* 9, 381 (1953). – E. SCHÜTZ, *Inaug.-Dissertation Würzburg*, 1954. – W. KÜNZER, E. AMBS, and D. SCHNEIDER, *Z. Kinderheilk.* 74, 652 (1954).

To 1.0 ml of blood similar amount of potassium cyanide (1%, 0.5%, 0.1% or 0.05%) and after 5 min 1.0 ml of 1% hydrogen peroxide was added. Hydrogen peroxide was dissolved in *M*/15 phosphate buffer of pH 7.0. Solutions of lower concentrations prepared from 1% potassium cyanide were diluted with the same buffer solution.

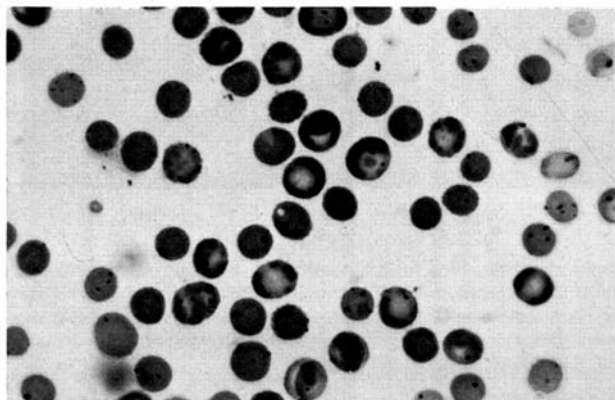
Samples taken at different periods were stained by the Wölfer staining technique with methyl violet⁴. It is well known that potassium cyanide, inspite of being an effective catalase poison⁵, does not produce Heinz bodies⁶. Probably this is due—if the catalase inhibition theory of Heinz body production is assumed—to the fact that cyanide also inhibits the genesis of peroxide.

In course of our experiments, we were able to state that exogenous peroxide produces Heinz bodies in the cyanide affected red blood cells kept at appropriate temperature. The onset of Heinz body formation as well as their number and size depends on temperature and on the concentration of cyanide.

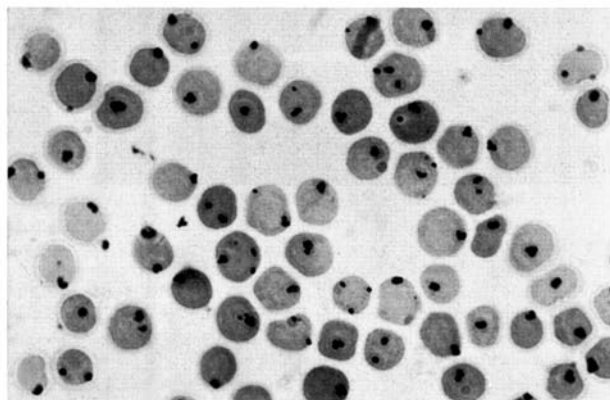
⁴ *Planches d'Hématologie Sandoz* (Basle 1950).

⁵ P. RONA, A. FIEGEL, and Y. NAKAHARA, *Biochem. Z.* 160, 273 (1925).

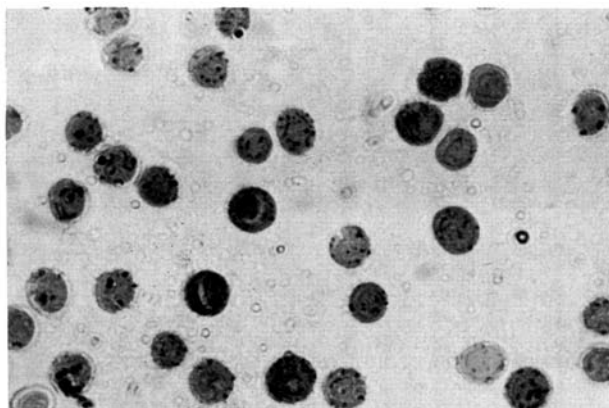
⁶ O. WALLER, *Folia haematol.* 73, 159 (1955).



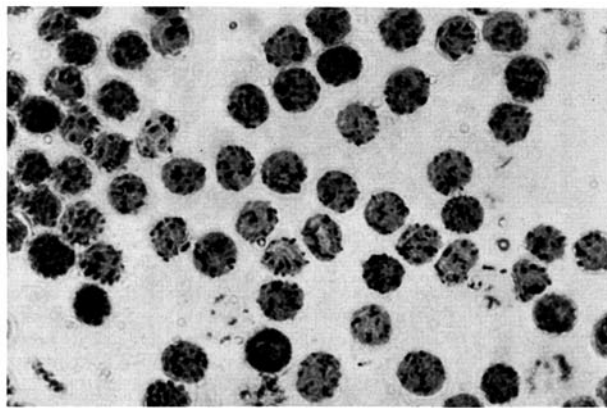
a after adding H_2O_2 at room temperature in the 20th min



b after adding H_2O_2 at room temperature in the 90th min



c after adding H_2O_2 at 37°C water bath in the 10th min



d after adding H_2O_2 at 37°C water bath in the 45th min

Heinz bodies in potassium cyanide poisoned red blood cells after treatment with hydrogen peroxide. 1.0 ml 1% KCN and 1.0 ml 1% H_2O_2 is added to 1.0 ml blood.

At room temperature, 1–3 small Heinz bodies appear in the red blood cells treated with potassium cyanide solutions of 1% and 0.5% in the 15–25th min. In the 40th min, the size of Heinz bodies increases but in most cells only 1–1 of them can be observed. These large Heinz bodies are seemingly formed by visible aggregation of several. A further growth is to be seen in the 90th min. The Heinz bodies observed in these experiments correspond morphologically to those produced *in vivo* on effect of aniline. At lower cyanide concentration (0.1% and 0.05%) there are no Heinz bodies in the 20th and only 1–2 very small ones occur in the 40th min. In the 90th min no difference in size was found, but in certain red blood cells 2 or even 3 Heinz bodies were observed.

The Heinz bodies appear at 37°C in the red blood cells exposed to the two higher concentrations of cyanide till the 5th min, whereas at lower concentration in the 5–10th min. Their number is higher than at room temperature. The disposition to aggregation is also seen at the two higher concentrations. This effect is lacking at lower concentration, however Heinz body production which is low at the beginning becomes very intensive after the 30th min, although the Heinz bodies produced keep their small character.

No Heinz body formation is observed in test tubes kept on melting ice. The close dependence on temperature suggests that peroxyde acts not directly but only initiates chemical processes leading to Heinz body formation. The role of cyanide cannot be limited to the catalase inhibition, as it is sufficient in 0.05% concentration to the total inhibition, whereas 1.0 ml of 1% potassium cyanide is sufficient to exclude practically catalase activity during 60 min⁵. However in experiments with the two higher concentrations, Heinz body formation begins after a shorter latent period and is more intensive. From this fact, it can be concluded that, similarly to the production of verdoglobine CN (pseudohemoglobine)⁷ in the chemical processes initiated by peroxyde, the catalase inhibiting substance plays a direct role. This is in accord with the verdoglobine A (choleglobine)⁸ or Heinz body⁹ production power of ascorbic acid. In these processes, ascorbic acid is not only needed as peroxyde-producing substance but also—similarly to cyanide—to achieve an adequate effect.

L. MAGOS

State Institute for Labour Hygiene, Budapest (Hungary), April 17, 1956.

Zusammenfassung

In den mit Cyanid vergifteten Erythrozyten produziert das exogene H₂O₂ bei geeigneter Temperatur Heinzsche Körperchen. Die Bildung der Heinzschen Körperchen, ihre Anzahl und Grösse ist von Temperatur und Cyanid-Konzentration abhängig.

⁷ G. BARKAN and O. SCHALES, *Z. physiol. Chem.* 253, 83 (1938).

⁸ R. LEMBERG, J. W. LEGGE, and H. W. LOCKWOOD, *Nature* 142, 148 (1938).

⁹ A. GAJDOS and G. TIPREZ, *C. r. Soc. biol.* 139, 545 (1945).

Il tenore di acido desossiribonucleico negli eritrociti di *Anas platyrhynchos*, *Cairina moschata* e dei loro ibridi diretti e reciproci*

Le ricerche quantitative sul comportamento del contenuto in acido desossiribonucleico negli ibridi appaiono di notevole interesse perchè non sempre esso è corrispondente nelle specie parentali e si pone il problema della sua distribuzione e stabilizzazione nel prodotto del loro accoppiamento, onde ottenere nuclei più o meno perfettamente equilibrati da un punto di vista funzionale, ottenendosi talora persino cellule germinali con potenzialità generativa.

Il presente lavoro fa seguito ad uno analogo compiuto da VIALLI e da me¹ sull'asino, il cavallo ed il mulo; si inquadra inoltre nella linea di ricerca prospettata da VIALLI² per l'istochimica comparativa dell'acido desossiribonucleico, che si presenta ricca di sviluppi per le connessioni con problemi di fisiologia e biologia nucleari. In particolare gli ibridi oggetto di questo studio rivestono maggiore interesse per essere intergenerici e non solo interspecifici (come il mulo).

Ho utilizzato per tale indagine strisci di sangue periferico di due esemplari di *Anas platyrhynchos* (un maschio ed una femmina), due di *Cairina moschata* (un maschio ed una femmina), tre di *Anas* × *Cairina* (un maschio e due femmine) e due di *Cairina* × *Anas* (due maschi): nominando tagli ibridi nel corso del lavoro è sempre indicata per prima la specie paterna.

Dopo aver praticato la reazione di FEULGEN su tutti i preparati (due per ciascun esemplare) in un unico blocco, ho eseguito le misurazioni fotometriche sui nuclei degli eritrociti (25 per ciascun striscio). A tale scopo ho utilizzato il modello di istofotometro di VIALLI³, ponendovi un diaframma fisso, la cui apertura corrispondeva, con l'ingrandimento da me usato (ob. 97 ×, oc. 16 ×) a 0,90 µ di diametro nel preparato; con esso veniva misurata una porzione dell'area nucleare variabile dal 12% al 5% circa. La misurazione a diaframma fisso, trattandosi di nuclei fortemente allungati, è risultata la più comoda e la più utile, come ho potuto accertare in una indagine, eseguita in collaborazione con MENEGHETTI GENNARO⁴ sui criteri di misurazione ottimali per la istofotometria in condizioni diverse di grandezza e di forma dei nuclei. L'elaborazione delle misurazioni, onde ottenere i valori di contenuto relativo in acido desossiribonucleico per nucleo, è stata descritta nel già citato lavoro, pure sugli ibridi, di VIALLI e GERZELI¹.

Nella Figura sono gli istogrammi comprensivi di tutti i dati ricavati per striscio, per esemplare e per animale; a fianco sono esposti i valori medi di contenuto in acido desossiribonucleico per nucleo, in unità arbitrarie, con indicazione delle corrispondenti deviazioni standard.

Un primo esame di questi valori dimostra, oltre ad una discreta differenza dei valori medi nei diversi animali, una estensione della curva di distribuzione dell'acido desossiribonucleico decisamente maggiore negli ibridi e precisamente negli esemplari di sesso maschile, rispetto

* Lavoro eseguito con un contributo del C.N.R. Il materiale è stato raccolto alla Stazione Sperimentale di Pollicultura di Rovigo, diretta dal prof. A. TAIBEL, al quale devo i più vivi ringraziamenti, anche per le utili indicazioni ed i consigli forniti.

¹ M. VIALLI e G. GERZELI, *Rend. Ist. Lomb. Sci. Lett.* 88, 273 (1955).

² M. VIALLI, *Boll. Zool.* 21, 153 (1954); *Monit. zool. Ital.* 62, 28 (1954).

³ M. VIALLI e S. PERUGINI, *Riv. Istochim. norm. pat.* 1, 149 (1954).

⁴ G. GERZELI e A. MENEGHETTI GENNARO *Anat. Anz.* 1956 (in stampa).