

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 (pseudohemoglobin)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.

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, ottendendosi 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 MENEGETTI 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 dessosiribonucleico 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 Pollicoltura 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).

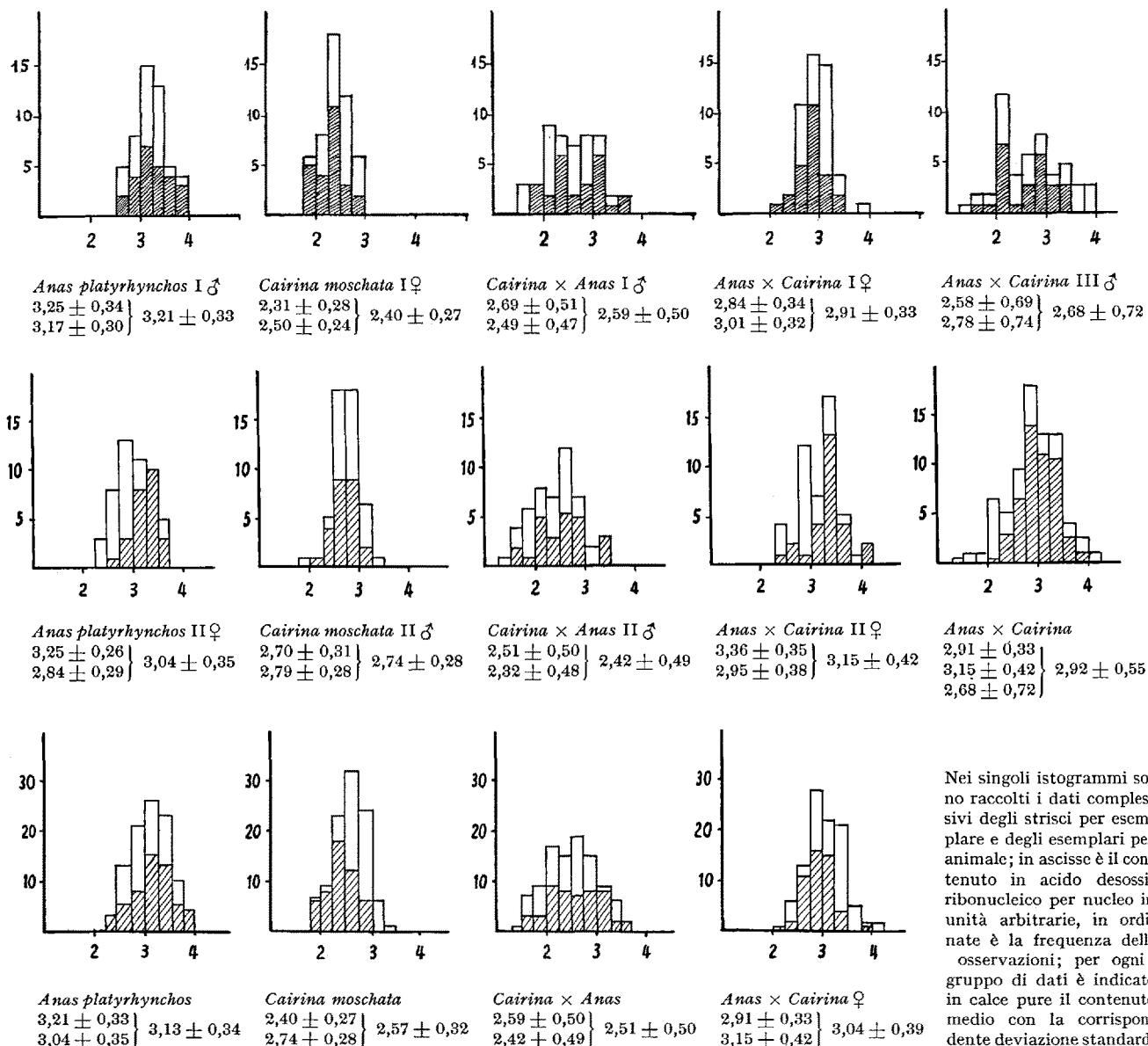
³ M. VIALLI e S. PERUGINI, Riv. Istochim. norm. pat. 1, 149 (1954).

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

⁷ G. BARKAN and O. SCHALE, 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).



Nei singoli istogrammi sono raccolti i dati complessivi degli strisci per esemplare e degli esemplari per animale; in ascisse è il contenuto in acido desossiribonucleico per nucleo in unità arbitrarie, in ordinate è la frequenza delle osservazioni; per ogni gruppo di dati è indicato in calce pure il contenuto medio con la corrispondente deviazione standard.

alle specie parentali; inoltre gli istogrammi indicano una tendenza alla bimodalità nelle distribuzioni dei valori negli stessi ibridi di sesso maschile.

Questa diversità nelle variabilità dei dati per i singoli gruppi (rivelata da una inomogeneità delle varianze, secondo il test di BARTLETT) non permette un'analisi complessiva della varianza⁵: ho cercato comunque quali di queste varianze fossero differenti fra loro per mezzo della *F* di SNEDECOR ed infine ho studiato tutti i singoli confronti fra medie logicamente interessanti (raggruppando inoltre i dati comunque ottenuti per esemplare e per animale), analizzando le differenze per mezzo del *t* di STUDENT (con la necessaria correzione del *t* tabulare nel caso di differenze significative fra le varianze).

Sono risultate differenze significative ad un livello elevato ($P < 0,001$) fra le varianze delle specie parentali rispetto agli ibridi maschi, fra i due ibridi reciproci e fra gli esemplari dei due sessi in *Anas × Cairina*.

Fra le medie sono apparse differenze significative ad un livello probativo:

- 1) nei preparati di *Anas platyrhynchos* II ♀ ($P < 0,001$), di *Cairina moschata* I ♀ ($P < 0,01$) e di *Anas × Cairina* ($P < 0,001$);
- 2) negli esemplari di *Cairina moschata* ($P < 0,001$) e *Anas × Cairina* ($P < 0,01$);
- 3) in *Anas* rispetto a *Cairina* ($P < 0,001$), *Anas × Cairina* ♂ ($P < 0,001$), *Anas × Cairina* ($P < 0,01$) e *Cairina × Anas* ($P < 0,001$); in *Cairina* rispetto ad *Anas × Cairina* ♀ ($P < 0,001$) e *Anas × Cairina* ($P < 0,001$); in *Cairina × Anas* rispetto ad *Anas × Cairina* ♀ ($P < 0,001$) e *Anas × Cairina* ($P < 0,001$).

Si può ritenere che le differenze riscontrate fra alcuni strisci di uno stesso individuo e fra gli esemplari di *Cairina moschata* siano dovuti a fattori tecnici e non biologicamente rilevanti (ammessa la costanza del tenore in acido desossiribonucleico per nuclei interfasci non più moltiplicantisi di organi corrispondenti in condizioni funzionali simili). Sono invece da prendere in particolare

⁵ C. H. GOULDEN, *Methods of Statistical Analysis* (Wiley & Sons, New York 1952).

esame le altre differenze che appaiono indipendentemente dalle preddenti (e direi nonostante queste) fra varianze e fra medie nei diversi esemplari di *Anas × Cairina* e nei vari animali.

Nel complesso le due specie parentali si sono rivelate nettamente differenti per tenore medio in acido desossiribonucleico (è maggiore di circa il 20% in *Anas platyrhynchos*).

Negli ibridi la variabilità dei singoli dati è stata più elevata, ma solo negli esemplari di sesso maschile, di quella nelle specie parentali; la tendenza alla bimodalità osservabile negli istogrammi può indicare la possibile presenza di due popolazioni di valori in ogni individuo.

Il tenore medio dell'ibrido *Cairina × Anas*, per cui disponevo solo di due esemplari maschi, è stato corrispondente a quello della specie paterna, che presentava i valori più bassi.

L'ibrido reciproco ha mantenuto nel complesso un valore intermedio fra quelli delle specie parentali; però con una notevole differenza fra gli esemplari dei due sessi: mentre quello di sesso maschile ha presentato un valore medio uguale a quello dell'ibrido reciproco, nonché a quello della specie materna (con i valori minori), i due esemplari di sesso femminile hanno fornito un valore corrispondente a quello della specie paterna (con i valori maggiori).

È suggestiva la corrispondenza fra queste osservazioni (medie di valori e loro distribuzione) e la constatazione della profonda sterilità dei maschi di entrambi gli ibridi, mentre le femmine studiate erano giunte a deporre uova, indicando un maggior equilibrio dei loro gameti, confermato da una più regolare distribuzione dell'acido desossiribonucleico per nucleo.

Questi dati si prestano ad un confronto interessante con quelli già pubblicati riguardanti l'asino, il cavallo ed il mulo¹: quest'ultimo presentava, indipendentemente dal sesso, un tenore intermedio fra quelli delle specie parentali; non erano presenti inoltre le irregolarità nella distribuzione dei singoli dati, riscontrate in questi ibridi di anitra, particolarmente nei maschi.

Si tratta di risultati che invitano ad una estrema prudenza, già in precedenza espressa¹, prima di giungere a conclusioni generali: ulteriori chiarimenti sono da attendersi da un'estensione delle ricerche ad altri ibridi, prendendo in esame anche le cellule germinali oltre che le somatiche e, nel caso di fertilità, anche solo relativa, pure i prodotti della seconda generazione e dei reincroci ottenibili.

Per quanto compiute in campo diverso meritano un cenno, perchè si allacciano a tali questioni, le osservazioni di LEUCHTENBERGER e coll.⁶ che in spermatozoi umani notarono caratteristiche alterazioni della distribuzione e del contenuto medio in acido desossiribonucleico, in rapporto ad alterazioni delle capacità riproduttive.

È di un certo interesse infine confrontare questi dati istofotometrici con i caratteri cromosomici; in MATTHEY⁷ ed in WHITE⁸ sono raccolte e valutate criticamente diverse osservazioni sulle specie qui esaminate ed i loro ibridi. Si nota come non vi sia accordo completo sul numero complessivo dei cromosomi e sui caratteri degli eterocromosomi: comunque le due specie parentali differirebbero di pochissimo e così pure l'ibrido. Al con-

trario il contenuto in acido desossiribonucleico si presenta notevolmente diverso, ciò che indicherebbe una indipendenza di questo valore dal numero dei cromosomi. Non è possibile per ora accettare la ragione di questa diversa carica in acido desossiribonucleico per cromosoma, in specie con cromosomi morfologicamente così simili.

G. GERZELI⁹

Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Pavia, il 7 marzo 1956.

Summary

The deoxyribonucleic acid content in nuclei of erythrocytes in *Anas platyrhynchos*, *Cairina moschata* and their direct and reciprocal hybrids is studied by the quantitative method. A significant difference was found between the amounts in the two parental species. The hybrids reveal an irregularity in behaviour of their means and distribution of contents. This seems to be dependent on their origin and sex. These findings are discussed and critically compared with other data from the literature, concerning the deoxiribonucleic acid content and chromosome-characteristics.

⁹ Borsista del C.N.R.

Relationship Between Passive Hemagglutination of Tanned Red Cells Coated with Fraction I and Fibrinolysis in Cirrhosis of the Liver

The BOYDEN method¹ has been applied by KISSMEYER-NIELSEN² to the fixation of platelet extract on the surface of red cells and to the study of rabbit antibodies against human thrombocytes. SAUER and VAN LOGHEM³, KISSMEYER-NIELSEN⁴, DAUSSET, BERGEROT-BLONDEL and BRECY⁵ used this method for the study of hemorrhagic syndromes in human subjects. It has been shown by DUCOS⁶ and confirmed by us, that the platelet extract can be replaced by fibrinogen.

It appears to us that this reaction was frequently strong in severe cases of cirrhosis of the liver associated or not with a hemorrhagic syndrome but always accompanied by moderate thrombocytopenia. In studying this reaction, we noted that it was: (1) negative when the serum was obtained immediately after clotting by the use of mechanical agitation with glass beads, and (2) strongly positive when the serum was separated from the clot after an incubation period of 1 to 2 h at 37°C.

These facts led to the investigation of the role of the clot in this reaction. We made a cross experiment of clots the results of which are given in the Table I. As can be seen, the reaction is positive only, when the patient's clot was incubated in pathological as well as in normal sera, or even in physiological saline. During the incubation the patient's clot liberates a substance capable to react with

¹ S. V. BOYDEN, J. exper. Med. 93, 107 (1951).

² F. KISSMEYER-NIELSEN, Vox Sanguinis 3, 123 (1953).

³ A. J. SAUER and J. J. VAN LOGHEM, Vox Sanguinis 4, 120 (1954).

⁴ F. KISSMEYER-NIELSEN, Sang 26, 117, 123 (1955).

⁵ J. DAUSSET, Y. BERGEROT-BLONDEL, and H. BRECY, Sang 9, 861 (1955).

⁶ J. DUCOS, National Congress of Blood Transfusion, Bordeaux (1956).

⁶ C. LEUCHTENBERGER, F. SCHRADER, D. R. WEIR e D. P. GENTILE, Chromosoma 6, 61 (1953).

⁷ R. MATTHEY, *Les Chromosomes des Vertébrés* (Librairie de l'Université, Lausanne 1949).

⁸ M. J. D. WHITE, *Animal Cytology and Evolution* (University Press, Cambridge 1954).