

venous injection of 100 mg "Triton WR-1339"***. Electrophoresis was carried out in barbital buffer of pH 8.8 and ionic strength 0.1 by the "Starch Block" or "Paper Sandwich" techniques of KUNKEL and SLATER⁵. The separation of the α -lipoproteins was better by the "Starch Block" technique since lipoproteins appear to be adsorbed less on starch than on paper. With rat sera, especially, good separations could not be obtained by paper electrophoresis. 1 or 2 cm³ of serum were used for each experiment. Human serum albumin, when employed, was added to the barbital buffer to a concentration of 2.50 g%. When albumin was present in the buffer

HUMAN SERUM FROM LEUKEMIC PATIENT PAPER ELECTROPHORESIS

CONTROL: — ALBUMIN-I¹³¹
--- PHOSPHOLIPID
..... CHOLESTEROL

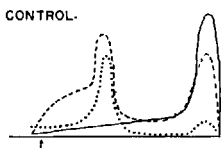
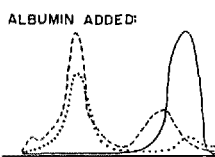


FIG 1



HYPERCHOLESTEROLEMIC RABBIT SERUM STARCH BLOCK ELECTROPHORESIS

CONTROL: — ALBUMIN-I¹³¹
--- PHOSPHOLIPID
..... CHOLESTEROL

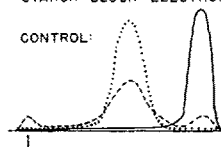
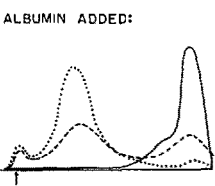


FIG 2



HYPERCHOLESTEROLEMIC RAT SERUM STARCH BLOCK ELECTROPHORESIS

CONTROL: --- PHOSPHOLIPID
— PROTEIN
..... CHOLESTEROL

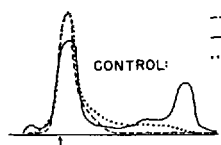
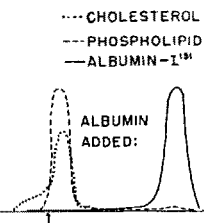


FIG 3



the position of the albumins in the experimental serum was marked by adding tracer amounts of I¹³¹-labelled human serum albumin⁶, which was shown to be a satisfactory marker for the animal albumins also. Electrophoretic separation was carried out for 24–38 h at room temperature with a potential of 300 V and a current of 10 mA. The electropherograms were cut into 1 cm segments and protein was measured in saline eluates by the Biuret reaction. Cholesterol was determined by the methods of ZLATKIS⁷ on aliquots of a Bloor extract. Albumin-I¹³¹ was assayed with a scintillation counter using a thallium-activated sodium iodide crystal, and radiophosphorus was determined by Geiger counting of a protein-free lipid extract.

Figures 1 to 3 show the results of typical experiments. Our results differ from MAURER's on two crucial points:

We were able to demonstrate both α - and β -lipoprotein peaks, but could not detect any albumin-induced shift of either lipid phosphorus or cholesterol from the β -globulin to the albumin region of the electropherograms.

Several possible explanations of these differences can be postulated. In our work much larger volumes of serum were employed, and this tends to minimize adsorption effects⁸. Lipoprotein denaturation appears likely in MAURER's experiments, judging from the large amounts of lipid phosphorus remaining near the origin and from diffuse distribution of the phospholipids migrating in the absence of added albumin. We established that albumin is capable of binding lipids by adding the lipids from deproteinized human lipoproteins to rat serum. Adding albumin to the buffer doubled the amount of extraneous lipids which migrated in electrophoresis with the rat proteins. ARMSTRONG⁹ has noted that partial denaturation may increase the electrophoretic mobility of human lipoproteins considerably, which may explain the abnormally high electrophoretic mobility of "lipoproteins" observed by MAURER¹⁰ after the addition of human α - and β -globulin. Denaturation also appears indicated by the fact that MAURER was unable to demonstrate two lipoprotein peaks in rabbit sera. The data of LEWIS¹¹ show that at least a third of the total lipids is carried as a β -lipoprotein in this species. We believe that under the conditions employed by MAURER an almost complete denaturation of lipoproteins occurred, and that the conclusions drawn by MAURER regarding the nature of protein-lipid binding in serum lipoproteins are therefore not sufficiently substantiated.

W. FLORSHEIM, B. DIMICK, and
M. E. MORTON

Radioisotope Service, Veterans Administration Hospital, Long Beach, California, and Department of Physiological Chemistry, University of California Medical School, Los Angeles 24, California, June 4, 1956.

Zusammenfassung

Im Gegensatz zu MAURER'S Angaben konnte keine Wirkung des dem Puffer zugegebenen Serum-Albumins auf die elektrophoretische Wanderung von Serumphospholipiden und Cholesterin im menschlichen und tierischen Serum festgestellt werden. MAURER'S Befunde scheinen auf einer durch Adsorptionseffekte bewirkten Veränderung der Lipoproteine zu beruhen.

⁸ A. MARIANI, R. C. Ist. sup. Sanità 15, 337 (1952).

⁹ S. H. ARMSTRONG JR., M. J. E. BUDKA, and K. C. MORRISON, J. Amer. chem. Soc. 69, 416 (1947).

¹⁰ W. MAURER and E. R. MULLER, Biochem. Z. 324, 255 (1953).

¹¹ L. A. LEWIS, A. A. GREEN, and I. H. PAGE, Amer. J. Physiol. 171, 391 (1952).

*** Rohm & Haas Co., Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.

⁵ H. G. KUNKEL and R. J. SLATER, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 80, 42 (1952).

⁶ R. C. GILMORE, M. C. ROBBINS, and A. F. REID, Nucleonics 12, 65 (1954).

⁷ A. ZLATKIS, B. ZAK, and A. J. BOYLE, J. Lab. clin. Med. 41, 486 (1953).

Hypertension expérimentale et protéines sériques

Différents groupes d'auteurs (BOUCHNUT, FROMENT et GRASSET¹, PAGE et CORCORAN², RAASCHOU³, LOYKE⁴)

¹ L. BOUCHNUT, R. FROMENT et E. GRASSET, Lyon méd. 160, 3 (1937).

² I. PAGE and A. CORCORAN, Ann. Rev. Med. 2, 51 (1951).

³ F. RAASCHOU, Circulation 10, 511 (1954).

⁴ H. LOYKE, Amer. J. med. Sci. 230, 627 (1955).

ont observés que les patients atteints de cirrhose hépatique ne souffraient que très rarement d'hypertension essentielle. Si la cirrhose guérit et que les protéines sériques se normalisent (exprimées par le quotient A/G), une hypertension essentielle peut alors se manifester. Par contre la cirrhose n'influerait pas l'hypertension néphrogène.

Les travaux de HANDLER et BERNHEIM⁵ ont montré qu'un rat rendu hypertendu par ischémie rénale redevenait normotendu s'il était soumis à un régime sans choline.

On sait que l'ischémie rénale aiguë produit une hypertension par le mécanisme suivant: La rénine libérée par l'ischémie rénale aiguë active l'hypertensinogène fournie par la fraction globulinique α_2 et donne naissance à l'hypertensine. Ce mécanisme ne vaut que pour l'hypertension aiguë. Par nos essais nous avons voulu voir si une modification de la fraction α_2 jouait un rôle d'une part dans la genèse de l'hypertension, et d'autre part dans la normalisation de la tension artérielle par un régime sans choline.

Essais. Groupe A. Sur 15 rats mâles blancs de 200 à 220 g on procède à l'ablation d'un rein. On entoure l'autre rein d'une capsule en matière plastique. On contrôle régulièrement la tension de ces rats (méthode plethysmographique). Chez les animaux ainsi opérés on constate bientôt une hypertension qui reste constante.

La tension étant demeurée constante pendant 4 à 6 semaines, ces rats reçoivent alors un régime sans choline. La tension s'abaisse régulièrement et nos résultats corroborent ceux de HANDLER et BERNHEIM⁶. Lorsque la tension demeure définitivement basse (resp. normale) nous sacrifions ces animaux. Nous étudions la répartition des protéines sériques par l'électrophorèse sur papier.

Groupe B. 10 rats mâles de 200 à 220 g ont été opérés de la même façon que ceux du groupe A. Lorsque l'hypertension demeure fixe, nous tuons ces animaux et étudions la répartition des protéines sériques par l'électrophorèse sur papier.

Groupe C. Etude de la répartition des protéines sériques (électrophorèse sur papier) de 7 rats normaux.

Résultats (Tableaux I, II et III). Nous avons comparé statistiquement les résultats des 3 groupes A, B et C, afin de savoir s'il y a une différence significative dans la répartition des protéines sériques (Tableau IV).

Discussion. On constate entre les groupes A/C et B/C une modification significative de la fraction α_2 . Par contre, il n'y a aucun écart significatif entre les globulines α_2 des groupes A et B. Quant aux autres fractions protéiniques des différents groupes, elles ne présentent pas de variations significatives.

Si nous comparons les résultats enregistrés au cours de ces essais avec ceux qui nous sont fournis par la clinique, nous voyons que les patients porteurs de lésions rénales demeurent hypertendus malgré leur cirrhose, et qu'un retour des protéines sériques à la normale peut, chez un cirrhotique, s'accompagner d'hypertension essentielle.

Or les rats du groupe A sont hypertendus (lésions rénales). Soumis à un régime sans choline, ils redeviennent normotendus. La répartition des globulines α_2 ne diffère pourtant pas de celle des rats hypertendus (les autres fractions sont également statistiquement semblables).

La comparaison entre les fractions α_2 des séries B et C aurait pu nous faire croire que l'augmentation des globulines α_2 jouait un rôle déterminant dans la genèse de

l'hypertension, et qu'elles activaient un autre système presseur. L'étude de ces globulines α_2 des rats du groupe A ne nous a pas permis de confirmer cette hypothèse. Il aurait fallu enregistrer dans ce groupe une diminution de cette fraction α_2 , ce qui n'est pas le cas.

Tableau I. A. Capsule périrénale + régime sans choline

	Albu- mine	α_1	α_2	β	γ	A/G
	36,0	13,0	10,0	28,3	12,7	0,50
	25,8	18,9	16,5	22,3	16,5	0,30
	19,2	30,6	16,3	24,2	9,7	0,22
	36,8	10,2	13,2	25,3	14,5	0,50
	25,0	16,0	24,8	21,2	13,0	0,30
	33,4	8,4	13,2	21,6	23,4	0,50
	42,0	15,9	9,6	22,0	10,5	0,70
moyenne arith. $\bar{x}$	31,17	16,14	14,80	23,56	14,33	0,431
dispersion s^2	64,59	53,66	26,72	39,36	21,25	0,37
écart standard s	8,03	7,32	5,16	6,56	4,61	0,61

Tableau II. B. Capsule périrénale

	Albu- mine	α_1	α_2	β	γ	A/G
	38,8	15,1	11,2	23,0	11,9	0,63
	26,2	20,9	12,1	23,4	17,4	0,36
	32,3	10,3	13,5	26,3	17,6	0,48
	35,0	15,2	10,3	25,2	14,3	0,54
	29,0	23,0	12,7	25,4	9,7	0,41
	35,8	16,1	9,8	21,8	16,5	0,55
	35,0	14,2	9,8	24,2	17,5	0,54
	29,5	18,6	8,2	30,4	13,3	0,42
moyenne arith. $\bar{x}$	32,7	16,7	10,95	24,9	14,7	0,48
dispersion s^2	17,65	18,57	3,08	8,69	10,08	0,015
écart standard s	4,20	4,83	1,75	2,94	3,17	0,12

Tableau III. C. Rats normaux

	Albu- mine	α_1	α_2	β	γ	A/G
	38,9	9,6	7,2	26,6	17,7	0,64
	44,6	7,9	6,6	26,8	14,1	0,81
	35,0	14,5	7,5	22,6	20,4	0,54
	36,8	16,0	9,2	21,9	16,1	0,58
	30,6	10,0	8,2	32,8	18,4	0,44
	29,4	23,8	10,0	24,7	12,1	0,42
	40,5	17,1	7,9	21,6	12,9	0,68
moyenne arith. $\bar{x}$	36,54	14,12	8,09	25,29	15,96	0,59
dispersion s^2	29,27	30,53	1,34	15,38	9,35	0,016
écart standard s	5,41	5,52	1,15	3,92	3,51	0,13

Des auteurs⁷ ont démontré expérimentalement qu'il y avait dans l'hypertension un hyperaldostérionisme chronique. Nous savons que les stéroïdes sont liées aux albu-

⁵ F. BERNHEIM et PH. HANDLER, Amer. J. Physiol. 162, 375 (1950).
⁶ PH. HANDLER et F. BERNHEIM, Amer. J. Physiol. 162, 368 (1950).

⁷ J. GENEST, Science 123, 503 (1956).

Tableau IV
Signification de la différence entre les moyennes des 3 groupes

	Albumine	α_1	α_2	β	γ	A/G
A/B n = 13	t = 0,326 P < 0,8	t = 0,13 P < 0,9	t = 1,36 P < 0,2	t = 0,371 P < 0,9	t = 0,128 P < 0,9	t = 0,153 P < 0,9
A/C n = 12	t = 1,037 P < 0,4	t = 0,408 P < 0,7	t = 2,371 P < 0,05	t = 0,462 P < 0,7	t = 0,550 P < 0,6	t = 0,151 P < 0,9
B/C n = 13	t = 1,85 P < 0,1	t = 0,713 P < 0,5	t = 2,647 P < 0,05	t = 0,151 P < 0,9	t = 0,552 P < 0,6	t = 1,22 P < 0,3

mines sériques⁸. Il pourrait y avoir un trouble de la liaison protéines/aldostérone lorsque la répartition des protéines est altérée.

Peut-être pourrait-on expliquer l'action de l'ACTH qui, injectée à des rats néphrectomisés, provoque une hausse transitoire de la tension artérielle (HANDLER et BERNHEIM⁶), par une décharge passagère d'aldostérone. Nous constatons que seules les globulines α_2 sont modifiées dans nos essais et qu'en particulier le quotient A/G est inchangé dans les 3 groupes. En conclusion, nous pouvons dire que, si chez le rat hypertendu la fraction α_2 s'élève de façon significative, le retour à la normale par régime sans choline ne s'accompagne pas d'une diminution de la fraction α_2 mais que celle-ci demeure pratiquement la même que chez les rats hypertendus.

C. JACOT et H. STAUB

Clinique médicale universitaire, Bâle, le 1er juin 1956.

Summary

The authors investigated the distribution of serum proteins, especially the α_2 fraction, in rats with artificially induced hypertension (A), in similar rats made normotone by choline-free diet (B), and in a control group (C). A rise in the α_2 fraction of group A and B was found, without a significant change of the other serum proteins.

⁸ K. EIS-NESE, J. A. SCHELLMAN, R. LUMRY et L. SAMUELS, J. biol. Chem. 206, 411 (1954).

Differenzierungsmethode metachromatischer Zellen nach ihrem Säuregrad

Bei histochemischen Untersuchungen der Gewebsmastzellen, die zusammen mit LENNERT und BORSTELL durchgeführt wurden, erschien es verlockend, die pH-Abhängigkeit der metachromatischen Färbbarkeit quantitativ zu erforschen. Dazu wurde folgende Methode entwickelt.

Das zu untersuchende Gewebe – in unserem Falle Knochenmark – wird nach Paraffineinbettung 4 μ dick geschnitten, sorgfältig entparaffiniert und in Aqua dest. gebracht. (An Stelle von Schnitten lassen sich auch Ausstriche verwenden.)

Anschließend färben wir den Schnitt unter gleichmässigem Schwenken 5 min in einer 0,1%igen, wässrigen, gepufferten Toluidinblaulösung und differenzieren ihn 5 min in gepuffertem Aqua destillata der gleichen

Wasserstoffionenkonzentration. Das pH der Farblösung und der Spülflüssigkeit soll so niedrig sein, dass sich eben einige metachromatische Zellen anfärben. Bei dem Fall der Mastzellen des Knochenmarkes genügt ein pH von 2,62. Als Puffer eignet sich am besten das Veronalnatrium-Azetat-Gemisch von MICHAELIS.

Zum Entwässern wird der Schnitt 2 min in 96%igem Äthanol und 2 min in einmal gewechseltem Isopropylalkohol hin und her geschwenkt. Nach dem Isopropylalkohol trocknen wir ihn zwischen Fliesspapier ab und decken ihn in reines Zedernholzöl ein.

Das jetzt untersuchungsfertige Präparat wird unter dem Mikroskop mit einem Kreuztisch auf eine günstige Stelle eingestellt. In einem durch den Kreuztisch genau definierten Bezirk werden bei starker Vergrößerung alle Zellen mit metachromatischen Granula ausgezählt.

Danach entfernen wir das Deckglas – durch das nicht-erhärtende Zedernöl bleibt das Präparat unbeschädigt – und wiederholen den Färbevorgang bei einem pH einer höheren Stufe. Anschließend zählen wir wieder die gleiche Stelle bei der gleichen Vergrößerung aus. Diese Prozedur wird mit stufenweise zu erhöhendem pH so oft wiederholt, bis die Zahl metachromatisch tingierter Zellen einen Höchstwert erreicht. Er soll 200 Zellen nicht unterschreiten, um die Fehlerbreite möglichst klein zu halten. Der erzielte Höchstwert wird gleich 100% gesetzt. Die bei den niedrigeren pH gewonnenen Zahlen rechnet man in Prozentzahlen um und trägt sie mit den ihnen zugehörigen pH-Werten in ein Koordinatensystem ein.

Vor dem Färbegang können wir noch Reagenzien einwirken lassen, die Beziehungen zur metachromatischen Substanz haben, zum Beispiel Hyaluronidase, Ribonuklease, Wasser, organische Lösungsmittel usw. Das Ergebnis kann dann unter Umständen die Wirkungsweise der angewandten Lösung erklären.

In der Abbildung ist an Hand einiger Beispiele die pH-abhängige Färbbarkeit der Gewebsmastzellen des menschlichen Knochenmarkes dargestellt. Es wurden dazu Fälle ausgewählt, die mit einer starken Mastzellenvermehrung einhergehen: 3 Kurven stammen von Kranken mit Morbus Waldenström (zum Teil veröffentlicht von LENNERT¹) und eine Kurve von einer Mastzellenretikulose (LENNERT²).

Die Kurven I und II sind völlig gleich, obwohl sie von 2 verschiedenen Fällen von Morbus Waldenström stammen und unterschiedlich, nämlich in Formol bzw. Bleiazetat, fixiert sind. Die Kurve III ist von dem gleichen Fall gewonnen, der in Kurve II dargestellt ist, wurde aber nach zweistündiger Luronasebehandlung erzielt. Man sieht, dass die sauren Mukopolysaccharide von der Azidität der Hyaluronsäure nicht mehr färbbar, also

¹ K. LENNERT, Frankf. Z. Pathol. 66, 201 (1955).
² K. LENNERT, Europ. Hämatol. Kongress, Freiburg 1955.