

The aim of the second experiment was to test whether depolarization facilitates the entry into the cell of the postulated Ca compound; such evidence would be obtained if, at a constant value of external $[Ca]/[Na]^2$, depolarization were also to give rise to an uptake of labelled Ca. Ventricles were depolarized by raising the external K concentration to 100 mM; but this was done, in contrast to the first experiment, by adding KCl (solid) to the perfusion fluid. In this way the ratio $[Ca]/[Na]^2$ was kept constant. Figure 2 shows the effect of adding 100 mM KCl to (1) normal Ringer's fluid (Fig. 2a) and (2) to a fluid in which 75% NaCl had been replaced by LiCl (Fig. 2b), both fluids containing 1 mM labelled Ca. The two lower curves, in each figure, indicate that depolarization by added K does, in fact, increase the Ca-uptake. In the absence of Na (Li-Ringer + 100 mM KCl, see upper curves in both figures), a maximal Ca-uptake occurs which is comparable in magnitude to that obtained in Na-free Ringer without additional K, again in agreement with the initial hypothesis. Controls in which either 100 mM LiCl or 180 mM sucrose were added to Ringer's fluid (Fig. 2a) show that neither the increased ionic concentration nor the hypertonicity of the fluids are responsible for, or contribute to, the effects shown in Figure 2.

If, as these experiments suggest, inward movement of Ca activates the contraction of the heart, an increased Ca-uptake should also occur in the course of a single twitch. Evidence for this may be found in the fact that periods of electrical stimulation also increase uptake of labelled Ca (NIEDERGERKE, unpublished observation; cf. for similar effects in nerve⁵ and skeletal muscle⁶). In this context WEIDMANN's recent observation⁷ is of interest, viz. that the twitch tension of the heart can be enhanced by applying Ca momentarily during the course of a single action potential, which is also explicable by the initial hypothesis.

R. NIEDERGERKE

Department of Biophysics, University College, London, January 12, 1959.

Zusammenfassung

Froschherzventrikel nehmen eine zusätzliche Menge Calcium (bestimmt mit dem Isotop ⁴⁵Ca) aus der Perfluissigkeit auf:

1. wenn diese Na-frei ist (zum Beispiel, wenn NaCl ersetzt ist durch LiCl oder KCl);
2. wenn dieser zusätzliches KCl zugegeben und damit die erregbare Membran bei konstanter Na-Konzentration depolarisiert wird.

Gleichzeitig mit der erhöhten Ca-Aufnahme wird in beiden Fällen eine Kontraktur beobachtet. Das Ergebnis unterstützt die früher vorgeschlagene Hypothese, nach welcher die Kontraktion des Herzens durch eine spezielle Ca-Verbindung (einen «Aktivator») eingeleitet wird.

⁵ A. L. HODGKIN and R. D. KEYNES, J. Physiol. 138, 253 (1957).

⁶ C. P. BIANCHI, in SHANES, Pharmacol. Reviews 10, 252 (1958).

⁷ S. WEIDMANN, Exper. 15, 128 (1959).

Fibrinolyse im Kammerwasser
menschlicher und tierischer Augen

Fibrinolytische Fermente sind in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Organen nachgewiesen worden¹. Meist

¹ Lit. bei E. DEUTSCH, Blutgerinnungsfaktoren (F. Deuticke, Wien 1955).

handelt es sich dabei um Profermente, die erst durch Kinasen, Aktivatoren oder durch bestimmte chemische Behandlung in die aktive Form übergeführt werden. Um so überraschender war für uns die Feststellung, dass im Kammerwasser menschlicher und verschiedener tierischer Augen offenbar normalerweise eine geringe Spontanfibrinolyse nachweisbar ist.

Experimentelles. Die Kammerwasser wurden durch Punktion der vorderen Augenkammer in Lokalanästhesie beim Menschen, in Pentobarbitalnarkose bei Kaninchen und Katzen und unmittelbar nach dem Tode bei Pferden, Rindern und Schweinen gewonnen und bis zur Untersuchung eingefroren. Die fibrinolytische Aktivität wurde nach der von DAUSSET *et al.*² beschriebenen, indirekten, abersehr empfindlichen Methode der passiven Hämagglutination nachgewiesen. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass beim Fibrinabbau durch Plasmin eine Substanz entsteht, die tannierte und mit Fibrinogen behandelte Erythrozyten agglutiniert. Je stärker die Fibrinolyse, um so höher der Agglutinationstiter.

In Fibrinolyseansätzen ohne Streptokinase (SK) wurde die aktuelle, in Ansätzen mit SK die durch diese Aktivierungsart maximal erreichbare Fibrinolyse bestimmt. Die Ansätze enthielten folgende Komponenten:

- 0,1 ml Kammerwasser;
- 0,2 ml Rinder-Citratplasma als Fibrinogenquelle;
- 0,2 ml physiolog. NaCl oder 200 E SK (Varidase);
- 0,1 ml (4 E) Thrombin (Topostasin Roche).
- Inkubation während 30 min bei 37°C.

Anschliessend wurde vom eventuell noch vorhandenen Gerinnsel abzentrifugiert und zur Agglutination genau nach der Vorschrift von DAUSSET *et al.*² verfahren.

Ergebnisse. Die Agglutinationstiter, die ein Mass für die Fibrinolysestärke sind, finden sich in folgender Tabelle:

Spezies	n	Agglutinationstiter	
		Ohne SK	Mit SK
Mensch . .	8	1:4 bis 1:10	1:4000 bis 1:8000
Katze . .	5	1:10 bis 1:20	1:100 bis 1:400
Kaninchen	5	1:2 bis 1:8	1:40 bis 1:200
Schwein .	2	1:1 bis 1:2	1:10
Pferd . .	3	1:10 bis 1:20	1:10 bis 1:40
Rind . .	3	1:2 bis 1:10	1:2 bis 1:10

Wir dürfen annehmen, dass die durchwegs niedrigen Agglutinationstiter in den SK-freien Ansätzen tatsächlich einer geringen Spontanfibrinolyse entsprechen, da nicht geronnene, entweder fibrinogen- oder thrombinfreie Kontrollen negativ blieben. Analoge Ansätze mit Plasma anstelle des Kammerwassers sind höchstens unverdünnt schwach positiv. In der Tabelle sind die Tierarten in der Reihenfolge der SK-Aktivierbarkeit des fibrinolytischen Systems ihres Kammerwassers bzw. dessen Proaktivatorgehaltes³ angeordnet. Die maximale SK-Aktivierbarkeit des Kammerwassers bleibt hinter derjenigen des Plasmas zurück, beträgt doch der Agglutinationstiter im analogen Plasmaansatz für den Menschen 1:10000 bis 1:20000, für Katzen und Kaninchen 1:100 bis 1:1000. Die SK-aktivierten Kammerwasser von Mensch und Katze lysieren

² J. DAUSSET, Y. BERGEROT-BLONDEL und M. COLIN, Vox sanguinis 1, 95 (1956).

³ St. MÜLLERTZ, Thrombose und Embolie (Benno Schwabe, Basel 1955), p. 75.

das Gerinnsel innerhalb 30 min vollständig, Kaninchenkammerwasser teilweise, bei den übrigen ist makroskopisch keine Lyse zu erkennen.

Es ist damit nachgewiesen, dass Kammerwasser von Mensch und verschiedenen Tieren ein fibrinolytisches Fermentsystem enthält, das sich gegenüber SK qualitativ gleich verhält wie das entsprechende Plasma. Es ist ferner wahrscheinlich, dass die aktuelle fibrinolytische Aktivität im Kammerwasser grösser ist als im Plasma.

A. FRANCESCHETTI und E. EICHENBERGER

Universitätsaugenklinik Genf und Forschungsinstitut Dr. A. Wander A.G., Bern, 25. November 1958.

Summary

In the aqueous humour of human subjects and of various animal species, a fibrinolytic system has been demonstrated which, as regards streptokinase, shows the same properties as the corresponding plasma. Presumably the actual fibrinolytic activity in the aqueous humour is greater than in the plasma.

The Incorporation of H^3 -Thymidine in Newly Differentiated Nuclei of Roots of *Vicia faba*

FRIEDKIN and WOOD¹ have shown that labelled thymidine is readily utilized for desoxyribose nucleic acid (DNA) synthesis, whereas labelled thymine is not, and it has been concluded from biochemical studies that labelled thymidine is incorporated only into the DNA^{2,3,4}. H^3 -thymidine has been used to investigate, by means of autoradiography, the mode of replication of chromosomes^{5,6}. The observations discussed here concern the incorporation of H^3 -thymidine into the DNA in nuclei of cells beginning to elongate in roots of *Vicia faba*.

¹ M. FRIEDKIN and H. WOOD, J. biol. Chem. 220, 639 (1956).

² P. REICHARD and B. ESTBORN, J. biol. Chem. 188, 839 (1951).

³ M. FRIEDKIN, D. TILSON, and D. ROBERTS, J. biol. Chem. 220, 627 (1956).

⁴ M. DOWNING and B. S. SCHWEIGERT, J. biol. Chem. 220, 521 (1956).

⁵ J. H. TAYLOR, P. S. WOODS, and W. L. HUGHES, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 43, 122 (1957).

⁶ L. F. LA COUR and S. R. PELC, Nature 182, 506 (1958).

Seedlings of *V. faba*, with lateral roots, were grown at a temperature of 20°C in separate containers in 30 ml of tap-water to which 25 μ c of H^3 -thymidine (supplied by Messrs. Schwartz Inc. New York) was added. After 12 h the roots were washed in water and the plants transferred to pure tap-water. Roots were fixed at 2, 4, 6, 12, and 24 h after the beginning of treatment and autoradiographs of sections and squash preparations were prepared by the stripping film technique.

A surprising feature of the incorporation of H^3 -thymidine in *Vicia* roots is the intensive incorporation that occurs in the nuclei of some cells beginning elongation (Fig. 1). Autoradiographs over these nuclei show a greater density than any of those over meristematic nuclei, except in a few apical cells adjacent to the root cap. In roots fixed 2 h after the beginning of treatment, this intense labelling is found in about 25% of the cells at a distance of 3 to 5 mm behind the 1.5 to 2 mm of meristem. It begins in cells at a distance of approximately 1.9 mm from the tip of the root (Fig. 2a and 2b), as is evident from roots fixed after 2, 4, and 6 h. Some heavily labelled nuclei occur, however, in diminishing frequency as far back as 9 to 10 mm after 6 h, the full length of the available sections.

The intense labelling is at first confined mainly to long columns of nuclei in the cortex, the most heavily labelled nuclei being those furthest from the meristem. Grain counts show an increase in labelling up to 6 h, then the number of grains per nucleus is stable, indicating that the incorporation of H^3 -thymidine continues in these nuclei during the first 4 to 6 h. The frequency of labelled nuclei also increase for some time, and after 12 and 24 h the nuclei first to become heavily labelled are found further back in the root, in zones about 15 mm and 30 mm respectively.

In addition to nuclei which are evenly and intensely labelled, a few are found in which labelling is confined to some parts of the nucleus (Fig. 3a and 3b). This pattern of labelling is usually not connected with nucleolar chromatin or heterochromatic regions.

In all samples of roots a few labelled nuclei occur in elongating cells of the vascular system, but generally only the large obviously polyploid nuclei are labelled.

With exposures curtailed to 4 days, it was possible to make grain counts in autoradiographs of squash preparations of roots fixed after 2 h from the start of treatment. On average about twice as many grains were found over the nuclei at 4–7 mm from the tip than over the most intensely labelled interphase nuclei of the meristem in the same root. These grain counts indicate that in the clon-

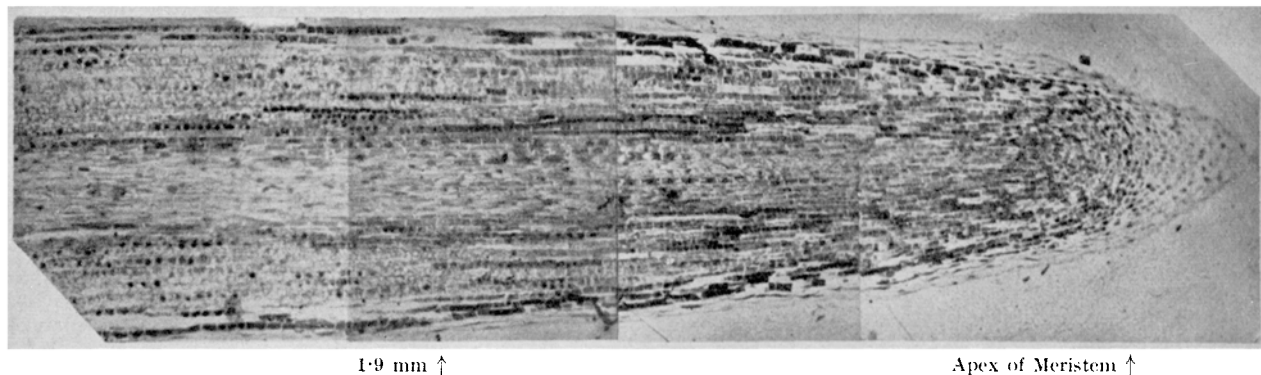


Fig. 1.—Incorporation of H^3 -Thymidine in a root of *Vicia faba*. Autoradiograph of a section, stained after photographic processing with Toluidine blue.