

Vergleichende röntgenhistoradiographische interferenzmikroskopische Trockengewichtsbestimmungen

Zellart	Röntgenhistoradiographische Messungen		Interferenzmikroskopische Messungen	
	Zellzahl	Trockengewicht in 10 ⁻¹² g	Zellzahl	Trockengewicht in 10 ⁻¹² g
Bullenspermien	16	7,87 ± 0,46	162	8,94 ± 1,17 ⁵
Bullenthymuslymphozyten	26	15,05 ± 0,53	96	14,40 ± 1,58 ⁵
Froscherythrozyten				
Kern	49	24,00 ± 0,69	26	21,55 ± 0,84 ⁵
Kern	18	21,29 ± 0,78	6	20,00 ± 0,72 ⁵
Plasma	29	89,24 ± 5,40	—	—
Plattenepithel der Mundschleimhaut				
Kern	5	77,80 ± 4,62	8	58,00 ⁸
Kern	22	70,36 ± 4,26	38	55,50 ± 2,6 ⁶
Plasma	27	1068,00 ± 84,00	8	2272,00 ± — ⁸
Plasma	—	—	37	1941,20 ± 61,5 ⁶

⁵ W. SANDRITTER, D. MÜLLER und H. G. SCHIEMER, Anat. Anz., 1959 (im Druck).

⁶ W. SANDRITTER, H. G. SCHIEMER, W. ALT, D. MÜLLER und E. BEHROUZI, Frankf. Z. Path. 69, 167 (1958).

parateträgern, die mit Mylarfolien bespannt waren, ausgestrichen. In allen Fällen, ausser den Mundschleimhaut-epithelien, kamen die gleichen Objekte mit beiden Methoden zur Untersuchung. Bei einer Spannung von 1,52 kV, 1,5 mA Röhrenstrom und 30 min Belichtungszeit wurden mit dem Historadiographen CMR 5 auf Kodak Max. Res. Plates Röntgen-Kontaktaufnahmen angefertigt und 6 min in G 209 A Gevaert bei 18°C entwickelt. Die Auswertung der Kontaktaufnahmen erfolgte mit einem Zytophotometer (SANDRITTER *et al.*⁷) mit einer Messblende von 5 µ². Die interferenzmikroskopischen Untersuchungen wurden mit der Analysatormethode durchgeführt (Bakersches Interferenzmikroskop, vgl. SCHIEMER *et al.*⁸).

Das Ergebnis der röntgenhistoradiographisch und interferenzmikroskopisch gewonnenen Trockengewichte zeigt die Tabelle. Die Messwerte zeigen eine gute Übereinstimmung. Die Abweichungen sind durch den systematischen Fehler beider Methoden bedingt. Diese Ergebnisse scheinen uns deshalb bemerkenswert, weil nicht nur die Genauigkeit der interferenzmikroskopischen und röntgenhistoradiographischen Technik aufgezeigt, sondern damit auch die von uns eingeführte Methodik der röntgenhistoradiographischen Trockengewichtsbestimmungen ohne routinemässige Verwendung eines Referenzsystems gesichert wird. So ist es erstmals möglich geworden mit dem einfachen Gerät CMR 5 quantitative Röntgenhistoradiographie bei geringem Arbeitsaufwand zu betreiben.

W. SANDRITTER und D. MÜLLER

Senckenbergisches Pathologisches Institut der Universität Frankfurt a. M., 10. November 1958.

Summary

Quantitative roentgen-histo-radiographic dry-weight determinations were made without a reference system. The results were compared to readings which had been obtained by the interference microscope. The readings from both methods correspond. The results show the range of error for both methods. It is remarkable that roentgen-histo-radiographic dry-weight determinations were made without using a reference system, once the dry-weight equivalent had been established.

⁷ W. SANDRITTER, W. MONDORF, H. G. SCHIEMER und D. MÜLLER, Mikroskopie (im Druck).

⁸ H. G. SCHIEMER, W. ALT und W. SANDRITTER, Acta Histochem. 4, 325 (1957).

PRO EXPERIMENTIS

A Method of Reducing the Fibrinolytic Activity of Endometrium Cells in Plasma Clot Tissue Culture

The difficulty of preventing growing cells from digesting plasma coagel has been a problem since the earliest days of tissue culture. Repeated efforts have been made to overcome this obstacle (LOSEE and EBELING¹, CARREL²). More recently, the trypsin inhibitor, isolated by KUNITZ³ from soya bean extract, has been used; but it was found to have a growth retarding effect and to prolong the coagulation time of the plasma (FISCHER⁴).

Certain cells, especially those of the uro-genital system, contain a large quantity of fibrinolysins; consequently the cells liquefy the plasma clot so much that there has been great difficulty in growing this kind of cell in tissue culture, even for short-term studies. In studying the endocrine reactions of rat endometrium *in vitro*, the present author met with this problem of preventing fibrinolysis. However, the addition of lysine-ethyl-ester (LEe) to the clot has made it possible to prevent its digestion by the endometrial cells. Experiments carried out by TROLL, SHERRY, and WACHSMAN⁵ have shown that esters of lysine and arginine are specific substrates for plasmin, the proteolytic enzyme of mammalian plasma. Aware of this fact, the present author used the LEe in the plasma clot of her experiments to prevent the fibrinolytic action of the epithelial cells of rat endometrium.

Method. Small slices of uterus from albino rats, spayed 4–6 weeks before the experiments, were explanted in Carrel flasks (D 5) in a solid phase containing 0.5 ml of cockerel plasma and 0.5 ml of 5% chicken embryonic extract in Tyrode's solution. In some cultures LEe was added to the extract, producing a final concentration in the clot of 1.25–12.5 mg/ml. This solution, however, was found to be acid (10 mg/ml of LEe in Tyrode has a pH value of 6.4). Therefore, as a control, a Tyrode solution

¹ J. R. LOSEE and A. H. EBELING, J. exp. Med. 19, 593 (1914).

² A. CARREL, J. exp. Med. 38, 407 (1923).

³ M. KUNITZ, Science 101, 668 (1945).

⁴ A. FISCHER, Science 109, 611 (1949).

⁵ W. TROLL, S. SHERRY, and J. WACHSMAN, J. biol. Chem. 208, 85 (1954).

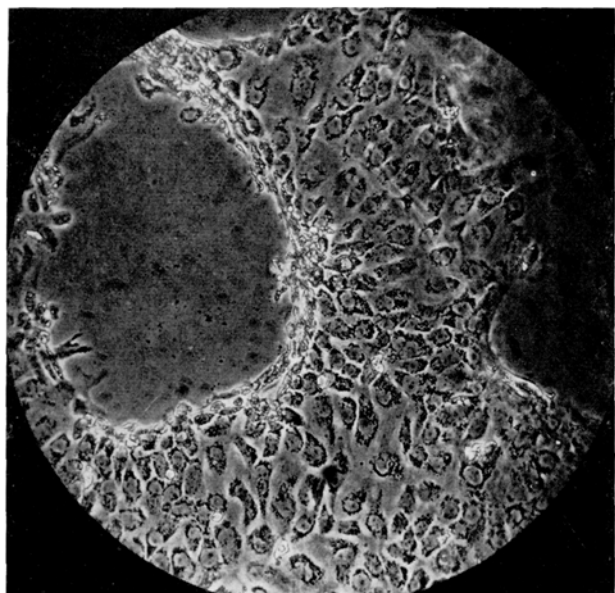


Fig. 1.—Endometrial cells, 5 days old, in control medium. Big vacuoles as a result of fibrinolysis; cells are somewhat dispersed. Magnification 110×

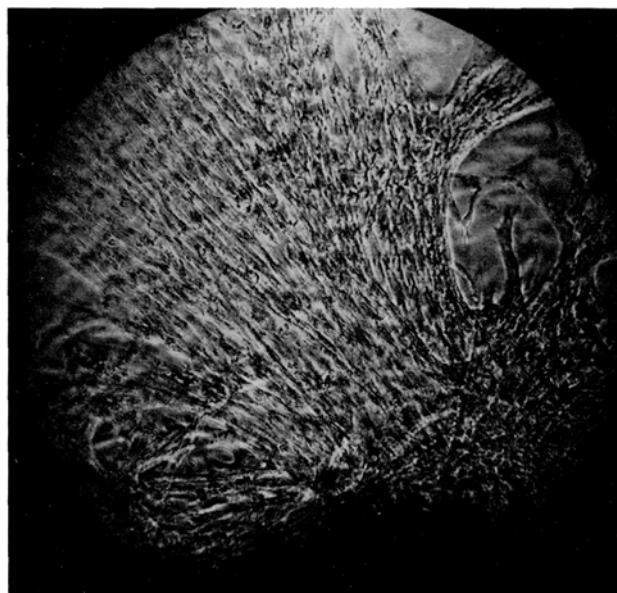


Fig. 3.—Fibroblastic outgrowth in control culture, 6 days old. Massive growth is apparent. Magnification 110×

was used with a pH adjusted to this level by reduction of bicarbonate. A third group consisted of cultures made with ordinary Tyrode's solution without LEE.

Results. After 2–3 days, the controls with ordinary Tyrode's solution showed an abundant outgrowth of epithelium containing big vacuoles as a consequence of fibrinolysis. On the 3rd and 4th day, many of the pieces became detached from the plasma clot due to the digestion by the cells. From the cultures still left in the clot, on the 4th and 5th days big vacuoles could be seen in the outgrowth as a result of the fibrinolysis (Fig. 1). Moreover, a massive invasive growth of fibroblasts into the epithelial cell sheets was often visible. The behaviour of the cells in the 'acid Tyrode' was identical with that of the con-

trols, and the same picture could also be seen in the cultures with the lowest concentration of LEE (final conc. 1.25 mg/ml). In the tissues cultured in the presence of LEE solution in a final concentration of 2.5–5 mg/ml, a retarded outgrowth could be observed beginning after 3–4 days. It was not as abundant as in the control flasks but could be characterized as good. It formed large epithelial sheets without fibrinolysis, only a few vacuoles were seen, and no pieces became detached from the plasma clot (Fig. 2). The fibroblasts were remarkably arrested in their growth, and no invasion of these cells into the epithelial growth could be observed (Figs. 3–4). Few fibroblasts could be seen in these cultures, and they appeared to be toxically affected. The outgrowth of epithelium

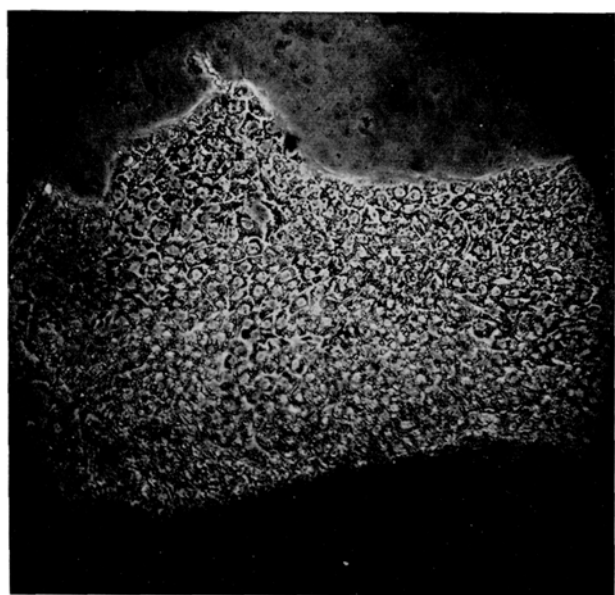


Fig. 2.—Endometrial cells, 6 days old, in a medium containing LEE 2.5 mg/ml. Continuous sheet of closely packed cells. Magnification 110×



Fig. 4.—Fibroblastic outgrowth in a culture with LEE 2.5 mg/ml, 6 days old. Poor growth. Magnification 110×

went on to the 8th–9th day, after which it showed degenerative signs. In tissues cultured in a medium containing higher concentration of LEE (12.5 mg/ml), the outgrowth of cells was slight or totally inhibited.

In different series of this type, the various endometria show diverse degrees of fibrinolytic activity. In the controls, good epithelial outgrowth with only slight fibrinolysis can sometimes be observed. In other cases, a final concentration of LEE of 2.5 mg/ml is not enough to prevent fibrinolysis and digestion of the clot, but a concentration of 5 mg/ml or higher has a good effect.

Discussion. The effect of LEE in preventing the liquefaction of high fibrinolytic tissue in a plasma clot is probably due to its power to work as an inhibitor competitive with the protein substrates of plasmin. The power of LEE to prevent selectively the outgrowth of fibroblasts is also of great value in endocrinological studies of the epithelial cells. According to experiments in our laboratory, the LEE seems to be of great value in preventing the fibrinolysis in cultures with other tissues from the uro-genital system, which earlier proved very difficult or impossible to culture because of the intense fibrinolytic activity of the cells. Successful studies have thus been carried out with prostatic hyperplasia, human placenta, and different malignant tumours of the uro-genital system.

B. INGEMANSON

*Department of Embryology, University of Lund (Sweden),
December 1, 1958.*

Zusammenfassung

Durch Zusatz von Lysin-äthylester (LEE) zum Plasma-koagel in einer Konzentration von 2,5–5 mg/ml ist es möglich, die fibrinolytische Aktivität des Endometriums in Gewebezuchten zu verhindern. Ausserdem hemmt LEE das Fibroblastenwachstum.

PRO EXPERIMENTIS

Organtypische und phasenspezifische Verteilung ungesättigter Lipoide im Schwanz der Larve von *Xenopus laevis*

Von den Lipiden in der Zelle ist bis jetzt nur bekannt, dass sie Bausteine wichtiger Zellorganoide, wie zum Beispiel der Mitochondrien, des hyaloplasmatischen Retikulums und der Kernmembran sind. Insbesondere die Phosphatide enthalten auch ungesättigte Fettsäuren. Alle fettartigen Substanzen sind relativ unspezifisch durch Sudan III oder Sudanschwarz nachweisbar. Eine histochemische Auftrennung der gesättigten und ungesättigten Komponenten ist bis jetzt nicht bekannt. WIGGLESWORTH¹ vermutet, dass nur ungesättigte Komponenten durch Osmiumtetroxyd geschwärzt werden. Ihre Menge kann offenbar während verschiedener physiologischer Funktionszustände relativ stark und rasch wechseln, was auch die Versuche von GEORGE und SCARIA² über die Verteilung von Lipasen im Muskel verschiedener Wirbeltiere bestätigen.

¹ V. B. WIGGLESWORTH, Proc. R. Soc. [B] 147, 185 (1957).

² J. C. GEORGE and K. S. SCARIA, J. Animal Morph. Physiol. 4, 107 (1957); Nature 181, 783 (1958); Naturwiss. 45, 93 (1958).

Herr Prof. Dr. LEHMANN regte deshalb an, die Veränderungen im Gehalt ungesättigter Lipide (u. L.) weiter zu verfolgen. Ein von BARROLIER³ für Papierchromatogramme beschriebener spezifischer Nachweis von ungesättigten Fettsäuren beruht darauf, dass an ungesättigten aliphatischen Bindungen mit Jodbromid Halogen angelagert und dieses mit Silbernitrat in Halogensilber überführt wird. Das Halogensilber wird mit einem Fotoentwickler (in unseren Experimenten stets Agfa 100) zu metallischem Silber reduziert. Diese Methode wurde von uns auf biologische Objekte übertragen und als histochemisches Reagens für ungesättigte Fettsäuren angenommen.

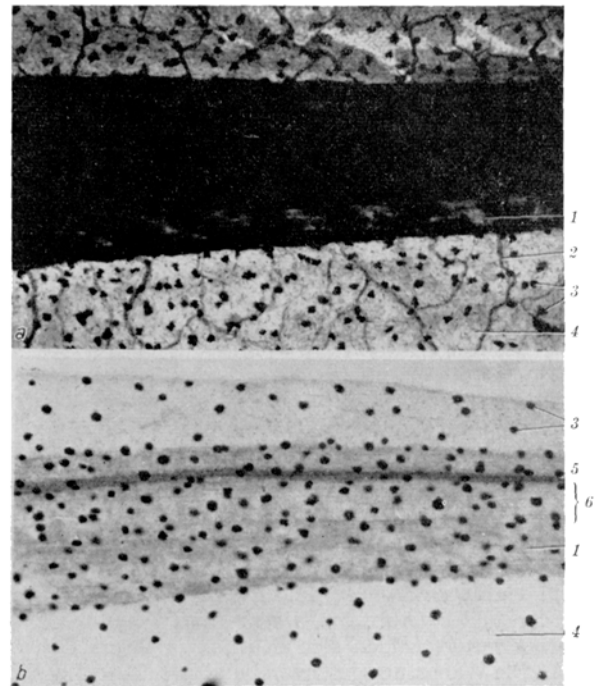


Abb. 1. a) IB2a. 40 Tage alte Larve. Starke Schwärzung von Muskulatur, Blutkörperchen und Mesenchymzellen. b) Ag R41. 47 Tage alte Larve, die 17 Tage gehungert hat. Muskulatur und Blutkörperchen nicht geschwärzt, das Rückenmark dagegen noch sehr deutlich versilbert. 1. Myotome. 2. Blutgefässe mit versilberten Blutzellen. 3. Chromatophoren. 4. Schwarzgraue Mesenchymzellen. 5. Rückenmark. 6. Chorda. – Mikrofotos von Totalpräparaten, etwa 80fach.

In Total- und Schnittpräparaten haben wir die differentielle Verteilung von ungesättigten Fettsäuren in den Organen des Schwanzes der *Xenopus*-Larve geprüft. Zunächst erkennt man eine *organtypische Verteilung* der u. L.: Die Muskulatur reagiert sehr stark. Das Zytoplasma der Blutzellen ist gleichmässig schwarzgrau, ihre Kerne sind völlig schwarz. Auch die Wände der Chordazellen sind deutlich geschwärzt. Nur wenig heller sind die verzweigten Mesenchymzellen in den Flossensäumen. Ihre Kerne heben sich weniger deutlich ab. Das Rückenmark wird gleichmässig dunkel gefärbt. Dagegen sind die Epidermiszellen mit Ausnahme einiger sehr feiner Granula frei von Silberablagerungen (Abb. 1a). Eine gewisse *individuelle Schwankung* der Reaktion trat unabhängig von der Änderung der Schichtdicke der Gewebe auf und erschwerte so quantitative Aussagen.

³ J. BARROLIER, Naturwiss. 44, 428 (1957).