

The fact that *isologous* marrow exposed to 1425 r still contained viable cells is of considerable interest. It would indicate that lethality from total body irradiation is not the result of bone marrow depletion alone, but due to damage to various organs, the bone marrow being actually more resistant to radiation than the body as a whole.

By the *in vitro* exposure of *homologous and heterologous bone marrow* to various dose levels of x-rays, it was hoped to remove host specificity and to abolish graft-versus-host reaction through x-ray induced mutation, chromosomal aberrations, breaks, deletion, and/or ploidy³. Obviously, several gene requirements would have to be altered in order that the foreign bone marrow be compatible with the new host⁴. It would appear that either *in vitro* irradiation did not render homologous and heterologous bone marrow immunologically incompetent, or that a 100% lethal dose might not adequately suppress the host's immunogenic system. Also, it would be conceivable to suspect that desoxyribonuclease played an important part in destruction of DNA that follows irradiation⁵. The inability of irradiated homologous and heterologous bone marrow to persist and proliferate, even temporarily in the new host, similar to isologous bone marrow, or to stimulate regeneration of the host's bone marrow was presumably because of the degree of genetic dissimilarity.

This investigation was supported in part by a grant from the National Institutes of Health, USPHS CY3335, and the Children's Cancer Research Foundation.

H. MEIER and BARBARA L. BROWN

The Children's Cancer Research Foundation and the Departments of Pathology, The Children's Medical Center and Harvard Medical School, Boston (Mass.), July 1, 1959.

Zusammenfassung

Wurde *in vitro* röntgenbestrahltes Knochenmark (475 r, 950 r, 1425 r) in letal bestrahlte Mäuse (LD 100/11 = 950 r) injiziert, so ergab sich: Isologes Knochenmark, mit 950 r bestrahlt, besitzt noch beachtliche Schutzwirkung; bestrahltes homologes und heterologes Knochenmark war weniger oder ganz inaktiv.

³ T. T. PUCK, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 44, 722 (1958).
⁴ N. A. MITCHISON, *Biological Replication of Macromolecules*, S. E. B. Symposia (Acad. Press. Inc., New York 1958), p. 225.
⁵ F. M. BACQ, P. FISCHER, A. HERVE, C. LIEBECQ, and S. LIEBECQ-HUTTER, Nature 182, 175 (1958).

Immediate Effects of UV Irradiation on the Isolated Rat Blastocyst

It has recently^{1,2} been reported that the inner cell mass of a rat blastocyst (4½ day after copulation) is destroyed after 1500 ergs/mm² of UV irradiation. By the tenth day of pregnancy, only cells descending from the trophoblast are found in a normally configured egg-chamber.

The present study is an attempt to elucidate these results, analyzing the immediate cytological changes after irradiation. We tried to investigate the following possible cytological effects:

(1) since it is well known³ that the UV irradiation can retard or inhibit cell division and cleavage, we counted mitoses and cells of the blastocysts.

(2) The inner cell mass of a normal mammalian blastocyst shows a pronounced affinity for pyronine⁴. Such cytoplasmic basophilia may disappear after UV irradiation, as has been shown in nucleate and anucleate fragments of ameba⁵.

(3) The pycnotic cells are often found after irradiation⁶ and the affinity of the nuclei for methyl green may disappear⁷.

As before, we used the modified egg-tranfer method⁸ together with irradiation. Owing to this technique, the transplanted eggs are always in the right uterine horn and those of the recipient in the left one.

In order to test these possibilities, we recovered the irradiated and transplanted blastocysts from the uterine horn of the recipient after 6 (Series 1) or 17 h following irradiation (Series 2). The eggs were fixed *in toto*⁴ and stained by the usual mixture after Unna-Brachet.

Series 1. The eggs recovered 6 h after irradiation (i. e. still the fifth day of pregnancy) showed no changes at all, if 1500 ergs/mm² were used, but they had some rare pycnotic cells after 3000 ergs/mm². The average number of cells after both doses was 31.77 ± 1.19. Of 6 blastocysts (3000 ergs/mm²) in three there were 4 pycnotic cells. Controls had the same number of cells (33 ± 2.93), but no pycnotic cells. A total number of 17 blastocysts with 550 cells has been counted.

Series 2. After 16-17 or 19 h (i. e. already the sixth day of pregnancy) the average number of cells was as follows (dose 1500 ergs/mm²):

Experiment (right uterine horn)		Controls (left uterine horn)	
a transplantation and irradiation	b transplantation only	b	a
(8) 26 ± 1.57*	(7) 48.43 ± 1.98	(5) 51 ± 4.09	(7) 49 ± 0.03
* = standard error. () = number of blastocyst. Total number: 27 blastocysts with 1146 cells.			

A considerable number of blastocysts were transplanted and irradiated, but only a small number was recovered and successfully fixed and stained.

Thus we may conclude that transplantation does not disturb the mitotic process, the number of cells being approximately the same as in the controls. Only the irradiated blastocysts have a smaller number of cells. The difference is highly significant (*P* < 0.01). This number (26) is not very different from the number of cells from series 1, recovered the fifth day of pregnancy (the difference is not significant).

The relative number of cells of the inner cell mass is approximately the same in irradiated blastocysts as in the controls (about 32-37%).

¹ N. ŠKREB and M. MÜLLER Proc. XVth Intern. Congr. Zool. London p. 1041 (1959).
² N. ŠKREB and M. MÜLLER Naturwiss. 46, 455 (1959).
³ R. F. KIMBALL, in A. HOLLAENDER, *Radiation Biology*, vol. II (McGraw-Hill Co. 1955, p. 285).
⁴ A. DALCQ, Bull. Acad. R. med. Belg. 18, VI. Sér., 236 (1952).
⁵ Y. ŠKREB and M. ERRERA, Exp. Cell Res. 12, 649 (1957).
⁶ S. P. HICKS, Arch. Pathol. 55, 302 (1953).
⁷ M. ERRERA, Biochem. biophys. Acta 7, 665 (1951).
⁸ N. ŠKREB, B. LEVAK, M. MÜLLER, and G. LUKOVIC, Naturwiss. 45, 451 (1958).
⁹ D. BODENSTEIN, J. cell. comp. Physiol. 43, Suppl. 1, 179 (1954).

Mitoses were found rather rarely both in transplanted eggs and in controls, so that no conclusions may be drawn.

Pycnotic cells were observed only in irradiated blastocysts. All pycnotic cells were stained deeply green after Unna-Brachet, and were Feulgen positive. ERRERA⁷, using stronger doses than we did, has found that the affinity of the nuclei for methyl-green is weak after UV irradiation, but BODENSTEIN's⁹ observations following treatment with mustard gas were the same as ours.

Out of 8 blastocysts 6 had 34 pycnotic cells of a total number of 208 cells, i. e. 16.35%.

As regards their position, in the majority of blastocysts the pycnotic cells were observed between the cells of inner cell mass and relatively rarely in the trophoblast. The difference is significant ($X^2 = 4.825$, $P < 0.05$).

The cytoplasm was normally stained with pyronine.

It can be concluded that the effect of UV irradiation (1500 ergs/mm²) may be observed about 17 h after irradiation: (1) the average number of the cells of a blastocyst is smaller than in controls, which may be explained by an inhibition of the mitotic process in the interphase of all cells,

(2) the pycnotic cells are readily visible and stain with methyl-green, especially between the cells of the inner cell mass.

N. ŠKREB and M. MÜLLER

Department of Biology, Faculty of Medicine, Zagreb (Yugoslavia), November 6, 1959.

Résumé

Sur le blastocyste du rat, irradié au cours de la transplantation par les rayons U. V. à la dose de 1500 ergs/mm², on a pu observer précédemment que le développement du bouton embryonnaire est bloqué, tandis que le trophoblaste continue à se développer.

Dans cette note, nous avons voulu mettre en évidence les effets immédiats de cette irradiation:

Bien que les affinités du cytoplasme et du noyau pour le mélange vert de méthyle-pyronine restent inchangées, les cellules ne continuent pas à se diviser. Les noyaux pycnotiques sont relativement plus fréquents dans le bouton embryonnaire que dans le trophoblaste.

«Bindung» eines synthetischen Polypeptides (Hypertensin) an Heparin und Freisetzung des Peptides durch Compound 48/80 *in vitro*

Der in den Mastzellen angereicherte Polysaccharid-schwefelsäureester Heparin liegt in diesen wohl vornehmlich als Histamin-heparinat vor^{1,2}. Derart gebundenes Histamin kann sowohl *in vitro* wie *in vivo* durch verschiedene sogenannte Histamin-Liberatoren wie Compound 48/80^{3,4} freigesetzt werden. WERLE und AMANN¹ konnten anhand von Dialyseversuchen zeigen, dass in Gemischen von Histamindihydrochlorid und Heparin (in Form des Na-Salzes) eine Bindung stattfindet mit Optimum im sauren Milieu (1%ige Essigsäure). Histamin lässt sich aus dieser Bindung durch Di- und Polyamine verdrängen. Da höhere Amine zu den wirksamsten Histamin-Liberatoren gehören^{1,5}, lag es nahe zu untersuchen, ob Heparin auch Peptide zu binden vermag, und ob solche «gebundene» Peptide durch einen Histamin-Liberator wie Compound 48/80 freigesetzt werden können. Unsere Versuche befassten sich zur Hauptsache mit einem synthetischen Oktapeptid, Hypertensin, dessen Synthese und Pharmakologie von SCHWYZER *et al.*⁶ sowie MEIER *et al.*⁷

beschrieben wurden. Im Gegensatz zu der Versuchsanordnung von WERLE und AMANN wurde nicht handelsübliches Heparin, sondern Heparinsäure verwendet, welche durch Behandlung von Handelsheparin (Hoffmann-La Roche) mit einem Ionenaustauscher (Amberlite J. R. 120 in der H⁺-Form) gewonnen wurde⁸. Auf diese Weise erhaltene Heparinsäure besaß die gleichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie sie von WILANDER für ein mittels Elektrodialyse gewonnenes Präparat beschrieben wurden⁹. Die Bindungsfähigkeit eines solchen Heparinsäurepräparates gegenüber Histamin verhielt sich im übrigen etwa wie diejenige von Na-Heparinat in essigsaurem Milieu; ebenso konnte Histamin durch Compound 48/80 aus dieser Bindung freigesetzt werden. Der Nachweis der aufgetretenen Bindung zwischen Heparinsäure und Hypertensin sowie der Freisetzung wurde wie folgt erbracht: 4 mg Hypertensin (als essigsaures Salz) wurden in 6 ml destilliertem Wasser gelöst und bei 20°C gegen 194 ml destilliertes Wasserdialysiert (Dialyse-Schüttelverfahren). Nach beendeter Dialyse wurde der Hypertensin-gehalt des Aussendialysats an drei verschiedenen Testobjekten (Blutdruck des Huhns, isolierter Rattenuterus und isoliertes Meerschweinchen-Ileum) ausgetestet. Es wurde zum Beispiel gefunden, dass nach 3 h im gesamten mindestens 0,5 mg Hypertensin ins Aussendialysat übergetreten waren. Hypertensin erwies sich demnach erwartungsgemäß als eine im Vergleich zu Histamin langsam dialysable Substanz. Aus einem Gemisch von 4 mg Hypertensin mit 7 mg Heparinsäure trat unter den gleichen Versuchsbedingungen weniger als 0,001 mg Hypertensin ins Aussendialysat über. Der Zusatz von 4 mg des Histamin-Liberators Compound 48/80 zu einem Gemisch von 4 mg Hypertensin und 7 mg Heparinsäure erhöhte den Durchtritt von Hypertensin deutlich (auf 0,24 mg in 3 h).

Obwohl unsere Befunde *in vitro* und ohne Berücksichtigung verschiedener physikalisch-chemischer Faktoren (pH, Diffusionsgeschwindigkeit, usw.) erhoben wurden, erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass «Bindungs»-Reaktionen von der Art der hier beschriebenen eine prinzipielle physiologische Bedeutung besitzen. Jedenfalls weisen sie auf Vorgänge hin, die im Zusammenhang mit der physiologischen und pathogenetischen Funktion von Peptiden sowie homöostatischen Regulationsprozessen unter Beteiligung saurer Polysaccharide eine Rolle spielen könnten.

R. JÄQUES, K. KÜTTNER,
H. J. BEIN und R. MEIER

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, 11. Januar 1960.

Summary

It is shown that a synthetic octapeptide, hypertensin, can be bound to heparin *in vitro* in a fashion similar to that of histamine. Hypertensin can be liberated from this 'complex' by Compound 48/80.

¹ E. WERLE und R. AMANN, *Naturwissenschaften* 42, 588 (1955); *Klin. Wschr.* 34, 624 (1956).

² Editorial: *Brit. med. J.* 2, 219 (1956).

³ Herrn Dr. A. C. WHITE, Wellcome Research Laboratories, Beckenham (England), danken wir auch an dieser Stelle für die Überlassung einer Versuchsmenge.

⁴ W. FELDBERG und W. D. M. PATON, *J. Physiol.* 114, 490 (1951).

⁵ F. C. McINTOSH und W. D. M. PATON, *J. Physiol.* 109, 190 (1949).

⁶ W. RITTEL *et al.*, *Helv. chim. Acta* 40, 614 (1957; *Angew. Chemie* 69, 179 (1957)).

⁷ R. MEIER *et al.*, *Exper.* 13, 361 (1957).

⁸ Herrn Dr. G. HUBER sind wir für die Herstellung von Heparinsäure zu Dank verpflichtet.

⁹ O. WILANDER, *Skand. Arch. Physiol.* 81, Suppl. 15 (1939).