

This simple derivation is intended to point out adsorption as the essential feature of intracellular ion accumulation studies in which the Michaelis-Menten treatment was used. These studies are thus brought in line with other investigations in which the Langmuir's adsorption formula was found to apply both in the case of living and non living systems<sup>3</sup>.

I wish to thank Drs. G. UNGAR and B. W. ZWEIFACH for their kind interest and encouragement.

E. ASCHHEIM

*Department of Pathology, New York University, Bellevue Medical Center, New York, February 5, 1960.*

### Résumé

On démontre l'identité formelle de l'équation de Langmuir (pour l'adsorption) et de celle de Michaelis-Menten, toutes deux fondées sur la loi de «mass action». Cette démonstration justifie la vue d'après laquelle l'accumulation des ions par les cellules vivantes selon la loi de Michaelis-Menten représente une liaison d'adsorption au niveau intracellulaire. Les centres d'adsorption, qui peuvent être inactivés par divers poisons chimiques, dépendraient du métabolisme de la cellule. Cette conception offre une alternative à l'hypothèse du «carrier» qui a été souvent postulée.

### Über die Beeinträchtigung der Wirkung von Spindelgiften in der Zellkultur durch menschliches Serum sowie durch Seren verschiedener Tierspezies

Über die Beeinflussung der Wirksamkeit von Pharmaka durch Serumproteine liegen in der Literatur zahlreiche Beobachtungen vor. In den meisten Fällen handelt es sich dabei nicht um eine Wirkung der Proteine auf das biologische Testobjekt, sondern um eine Bindung der betreffenden Wirkstoffe an Proteine, wodurch ihre Wirkung abgeschwächt oder der Wirkungseintritt verzögert wird. Noch relativ wenig sind aber die Unterschiede, die hinsichtlich dieser Bindungsfähigkeit zwischen den Seren verschiedener Tierarten bestehen, untersucht worden. Im folgenden soll kurz über eine Beobachtung auf diesem Gebiet berichtet werden.

Bei der Prüfung der zytostatischen Wirkung von Podophyllinabkömmlingen in der Gewebekultur verwendeten wir Fibroblasten von Hühnerembryonen und ein Nährmedium, das neben Rinderamnionflüssigkeit und Rinderembryoextrakt auch 5% Serum enthält<sup>1</sup>. Podophyllin bewirkt, wie Colchicin, eine Arretierung der Mitosen in der Metaphase, wodurch es zu einer Anhäufung der frühen und zu einer Abnahme der späten Mitosephasen kommt. Diese Wirkung ist in der Gewebekultur leicht zu beobachten und auch quantitativ zu erfassen, da das vollständige Verschwinden der Ana- und Telophasen einen gut definierten Endpunkt darstellt. Wir machten nun die Beobachtung, dass bei Verwendung von 5% Menschenserum andere Werte als mit pferdeserumhaltigem Medium erhalten wurden. Die meisten Untersuchungen wurden mit N-Dodecylpodophyllsäurehydrazid durchgeführt, und es ergab sich als Durchschnitt von 11 Versuchen, dass von diesem Präparat beim Arbeiten in menschenserumhaltigem Medium 3,05 ( $\pm 0,30$ )mal höhere Konzentrationen nötig sind als mit pferdeserumhaltigem Medium, um den

gleichen Effekt, nämlich die Arretierung aller Mitosen, zu erzielen. Der Unterschied ist nach dem *t*-Test statistisch hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Die voll antimitotisch wirksame Konzentration dieser Substanz liegt in unserer Versuchsanordnung bei  $10^{-6,6}$  (Menschenserum), bzw. bei  $10^{-7,1}$  (Pferdeserum). Beim von uns verwendeten Menschenserum handelt es sich um eine Mischung vieler Seren (Standardserum des Schweiz. Roten Kreuzes), die sowohl in getrockneter als auch in flüssiger Form identische Resultate ergab. Das Pferdeserum stammte von einzelnen Tieren und wurde von zwei verschiedenen Quellen bezogen. Ein Vergleich zwischen pferdeserumhaltigem und serumfreiem Medium zeigte, dass auch Pferdeserum die Wirkung der Podophyllinderivate abschwächt. In unserer Versuchsanordnung war mit Pferdeserum die doppelte Menge Dodecylpodophyllsäurehydrazid nötig, um eine gleiche Wirkung wie im serumfreien Medium zu erzielen.

Mit derselben Substanz wurden dann noch andere Seren in gleicher Weise, aber in einer geringeren Zahl von Experimenten untersucht. Menschliches Nabelschnurmischserum<sup>2</sup> ergab gleiche Resultate wie das von Erwachsenen stammende Standardserum. Die andern geprüften Seren (von Rind, Meerschweinchen, Ratte, Maus, Hahn) hingegen verhielten sich ungefähr gleich wie Pferdeserum, schwächten also die Podophyllinwirkung bedeutend weniger stark ab als Menschenserum. Seren von verschiedenen Kaninchen ergaben stark unterschiedliche Resultate. Alle Seren wurden in nichtinaktiviertem Zustand verwendet. Ein Vergleich beim Pferde- und Menschenserum zeigte jedoch, dass Inaktivierung (30 min 56°C) auf die hier untersuchte Serumeigenschaft keinen Einfluss hat.

Eine Reihe anderer Podophyllinderivate zeigte denselben, durch die Verwendung von Menschen- bzw. Pferdeserum verursachten Wirkungsunterschied wie das oben erwähnte Dodecylhydrazid. Hingegen konnte kein solcher Unterschied festgestellt werden beim Colchicinderivat Demecolcin<sup>3</sup>. Im Mittel von 7 Versuchen war hier mit menschenserumhaltigem Medium 1,016mal mehr Demecolcin nötig als im Medium mit Pferdeserum, ein Wert, dessen Abweichen von 1,00 natürlich noch weit innerhalb der Fehlergrenzen der Methode liegt. Da Fibroblasten von Hühnerembryonen in Medium mit Menschen- oder Pferdeserum etwa gleich gut wandern und sich vermehren, liegt der Gedanke nahe, für die unterschiedliche Wirkung der Podophyllinderivate in menschen- bzw. pferdeserumhaltigen Medien eine verschieden starke Bindung dieser Stoffe an die Proteine des Menschen- bzw. Pferdeserums verantwortlich zu machen. Diese Vermutung konnte durch Dialyseversuche bestätigt werden.

Ein bekanntes Beispiel für die Wirkstoffbeeinflussung durch Serumproteine sind die Herzglykoside. In dieser Stoffgruppe wurde gezeigt, dass kleine Verschiebungen

<sup>1</sup> A. CERLETTI, H. EMMENEGGER und H. STÄHELIN, *Actualités pharmacol.* 12, 103 (1959).

<sup>2</sup> Freundlicherweise vom Frauenspital Basel zur Verfügung gestellt.

<sup>3</sup> Verwendet wurde das Präparat Colcemid, CIBA.

<sup>4</sup> E. SUTER, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 2, 211 (1944).

<sup>5</sup> E. ROTHLIN und R. BIRCHER, *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk.* 5, 457 (1954).

<sup>6</sup> R. A. HOEKSTRA, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 162, 649 (1931).

<sup>7</sup> A. FARAH, *J. Pharmacol. exp. Ther.* 83, 143 (1945).

<sup>8</sup> E. K. OYAKAWA und B. H. LEVEDAHL, *Arch. Biochem.* 74, 17 (1958).

<sup>9</sup> J. AVIGAN, *Cancer Res.* 19, 831 (1959).

<sup>10</sup> J. V. TAGGART, *Amer. J. Physiol.* 167, 248 (1951).

<sup>11</sup> E. ROTHLIN, *Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich* 40, 195 (1945).

<sup>12</sup> A. GOLDSTEIN, *Pharmacol. Rev.* 1, 102 (1949).

in der Zahl und Stellung der OH-Gruppen im Aglykon-gerüst für die verschieden starke bzw. fehlende Bindung der Glykoside an Serumalbumin verantwortlich zu machen sind<sup>4,5</sup>. Beim Podophyllin liegen ebenfalls Anhaltspunkte für einen Einfluss der OH-Gruppe auf die Serumbindung vor, indem wir beim  $\beta$ -Peltatinsäuredodecylhydrazid, welches sich vom oben erwähnten Dodecylpodophyllsäurehydrazid nur durch die Stellung der OH-Gruppe unterscheidet, keinen Unterschied fanden zwischen der Wirkung im Medium mit Menschenserum und derjenigen im Medium mit Pferdeserum. Qualitativ wirkt das Peltatinsäurehydrazid in der Fibroblastenkultur gleich wie das Podophyllsäurehydrazid. Ebenfalls bei den Herzglykosiden wurde darauf hingewiesen, dass hinsichtlich Bindungsfähigkeit Unterschiede zwischen den Seren verschiedener Spezies bestehen<sup>4,6</sup>. Fast immer wurden, sowohl bei den Herzglykosiden als auch bei anderen Substanzen, höhere Bindungswerte für menschliches als für die meisten tierischen Seren (vielleicht mit Ausnahme des Kaninchensersums) gefunden, so zum Beispiel für Digitoxin<sup>4,7</sup>, für Testosteron<sup>8</sup>, für karzinogene Kohlenwasserstoffe<sup>9</sup> und für *p*-Aminohippurat<sup>10</sup>. Unsere Befunde bei Podophyllinabkömmlingen stehen damit also in Übereinstimmung.

Der Wirkungscharakter von Pharmaka wird zweifellos auch *in vivo* durch die Bindungsfähigkeit des Blutserums stark beeinflusst<sup>11,12</sup>. Es ist daher zu vermuten, dass allein schon die von uns beobachteten Differenzen zwischen verschiedenen Seren Speziesunterschiede bezüglich Wirkungsstärke und -charakter der geprüften Stoffe erklären könnten.

H. STÄHELIN

Pharmakologisches Laboratorium SANDOZ AG., Basel,  
25. April 1960.

### Summary

Chick embryo fibroblasts, cultivated *in vitro*, require higher concentrations of podophyllotoxin derivatives for complete mitotic arrest when the medium contains human adult or cord serum than when it contains horse, bovine, guinea pig, rat, mouse, or cock serum. This difference is due to a higher binding capacity of human serum for these compounds. No such difference was found with a colchicine and a peltatin derivative.

### Precisazioni sul Nucleolonema<sup>1</sup>

Molto di recente GONZALEZ-RAMIREZ<sup>2</sup>, in seguito ad osservazioni compiute al microscopio elettronico su cellule di organi emopoietici, ha riproposto la questione della struttura e dell'ultrastruttura del nucleolo. Egli, dopo avere ricordato che GONZÁLEZ-GUZMÁN aveva sostenuto l'esistenza di granuli argentofili intranucleolari, e che ESTABLE e SOTELO<sup>3,4</sup> avevano ammesso la presenza costante di un filamento avvolto a gomitolo da denominarsi nucleolonema, ha in effetti riconosciuto nel nucleolo, anziché un gomitolo, delle travate e dei filamenti fra loro anastomizzati «à la manière des alvéoles d'une ruche». Egli pertanto, nel tentativo di conciliare le diverse vedute, si è così espresso: «Si on considère le faible pouvoir de résolution du microscope optique, il n'est pas difficile de comprendre que des mailles irrégulières et parfois peu nombreuses, séparées par des fractions de microns, peuvent apparaître comme un filament plus ou moins

pelotonné, comme dans la description d'ESTABLE et SOTELO, tandis que ce que l'imprégnation argentique de GONZÁLEZ-GUZMÁN montre comme des grains argentophiles seraient les points d'union des branches de la structure réticulaire, points plus épais que le reste, ou bien la *pars amorpha* contenue entre les mailles du réticule.»

In base alle ricerche abbastanza numerose ormai compiute sull'argomento conviene fare le seguenti precisazioni:

1) Un filamento avvolto a gomitolo, quale hanno creduto di avere individuato ESTABLE e SOTELO coll'impiegare specialmente il metodo di impregnazione argenticca di ESTABLE<sup>4</sup>, in realtà non esiste<sup>6-7</sup>.

2) Tanto l'impregnazione argenticca quanto, e ancor meglio, quella platinica<sup>7-9</sup>, consentono di svelare nel nucleolo la presenza di granuli (Fig. 2, 3, 4), quali erano stati segnalati non solo da GONZÁLEZ-GUZMÁN, ma da numerosi altri autori. L'esistenza di tali granuli, indicati nel passato specialmente come «nucleolini», non è costante, ma legata a determinate condizioni fisico-chimiche del nucleolo. Se essi sono numerosi ed ammassati, con l'argento si verifica spesso una sovraimpregnazione tale da poter simulare un aspetto a gomitolo (Fig. 1), sovraimpregnazione che col platino<sup>8,9</sup> non ha luogo (Fig. 2). Le loro caratteristiche fisiche, rilevabili nei preparati ottenuti con particolari trattamenti, sono del tutto corrispondenti a quelle che si possono osservare nelle cellule allo stato vitale. Si fa notare la loro elevata rifrangenza ed il loro colorito rosso-granato, che vira al giallo col variare dell'angolo di incidenza della luce del microscopio. Tale colorito ripropone la questione delle zone Feulgen-positive endonucleolari. Agli stessi granuli si è ritenuto opportuno dare il termine di nucleolonemali, denominando filamenti nucleolonemali quei collegamenti che molto di sovente si rinvenivano fra gli stessi granuli<sup>7</sup>. Alla presenza di questi si accompagna spesso quella di vacuoli (Fig. 4), i quali si differenziano anche per un contenuto con un grado di rifrangenza nettamente inferiore.

3) Al microscopio elettronico, come comprovato ormai da numerose ricerche<sup>10-13</sup>, il nucleolo presenta molto di frequente un aspetto a reticolo. Questo non corrisponde al nucleolonema per i seguenti due motivi principali: a) non è impregnabile con i metalli pesanti; b) un reticolo con le sue numerose anastomosi non può costituire l'immagine di sezioni di un filamento avvolto a gomitolo. Il microscopio elettronico rivela, anche nell'ambito delle cellule dello stesso tessuto normale e patologico, nucleoli omogenei (Fig. 5), sì che occorre aderire al concetto espresso

<sup>1</sup> Ricerche sostenute da un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.

<sup>2</sup> J. GONZÁLEZ-RAMIREZ, Rev. Hématol. 14, 333 (1959).

<sup>3</sup> C. ESTABLE e J. R. SOTELO, Publ. Inst. Inv. Cien. biol. Montevideo 1, 105 (1951).

<sup>4</sup> C. ESTABLE e J. R. SOTELO, Symp. fine struct. cells Leiden, 170 (1954).

<sup>5</sup> J. H. TRAMEZZANI e V. VALERI, Simp. secr. celular Belo Horizonte, 68 (1955).

<sup>6</sup> M. HERTL, Z. Zellforsch. 46, 18 (1957).

<sup>7</sup> A. BOLOGNARI, Arch. Zool. Ital. 44, 53 (1959).

<sup>8</sup> A. BOLOGNARI, Atti Soc. Pelor. Sci. fis. mat. nat. Messina 3, 113 (1956/57).

<sup>9</sup> A. BOLOGNARI, M. ALBANESE e A. DONATO, Boll. Soc. ital. Biol. sper. 35, 764 (1959).

<sup>10</sup> W. BERNHARD, A. BAUER, A. GROPP, F. HAGUENAU e C. OBERLING, Exp. cell Res. 9, 88 (1955).

<sup>11</sup> D. W. FAWCETT, J. nat. Cancer Inst., 15 Suppl. 1475 (1955).

<sup>12</sup> A. F. HOWATSON and A. W. HAM, Proc. Cancer Res. Conf. 2, 17 (1957).

<sup>13</sup> W. WESSEL and W. BERNHARD, Z. Krebsforsch. 62, 140 (1957).