

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^{4,5}. Beim Podophyllin liegen ebenfalls Anhaltspunkte für einen Einfluss der OH-Gruppe auf die Serumbindung vor, indem wir beim β -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^{4,6}. 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 Kaninchenserums) gefunden, so zum Beispiel für Digitoxin^{4,7}, für Testosteron⁸, für karzinogene Kohlenwasserstoffe⁹ und für *p*-Aminohippurat¹⁰. 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^{11,12}. 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 Nucleolonema¹

Molto di recente GONZALEZ-RAMIREZ², 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^{3,4} 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 ESTABLE⁴, in realtà non esiste⁶⁻⁷.

2) Tanto l'impregnazione argenticca quanto, e ancor meglio, quella platinica⁷⁻⁹, 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^{8,9} 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 granuli⁷. 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 ricerche¹⁰⁻¹³, 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

¹ Ricerche sostenute da un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.

² J. GONZÁLEZ-RAMIREZ, Rev. Hématol. 14, 333 (1959).

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

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

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

⁶ M. HERTL, Z. Zellforsch. 46, 18 (1957).

⁷ A. BOLOGNARI, Arch. Zool. Ital. 44, 53 (1959).

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

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

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

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

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

¹³ W. WESSEL and W. BERNHARD, Z. Krebsforsch. 62, 140 (1957).

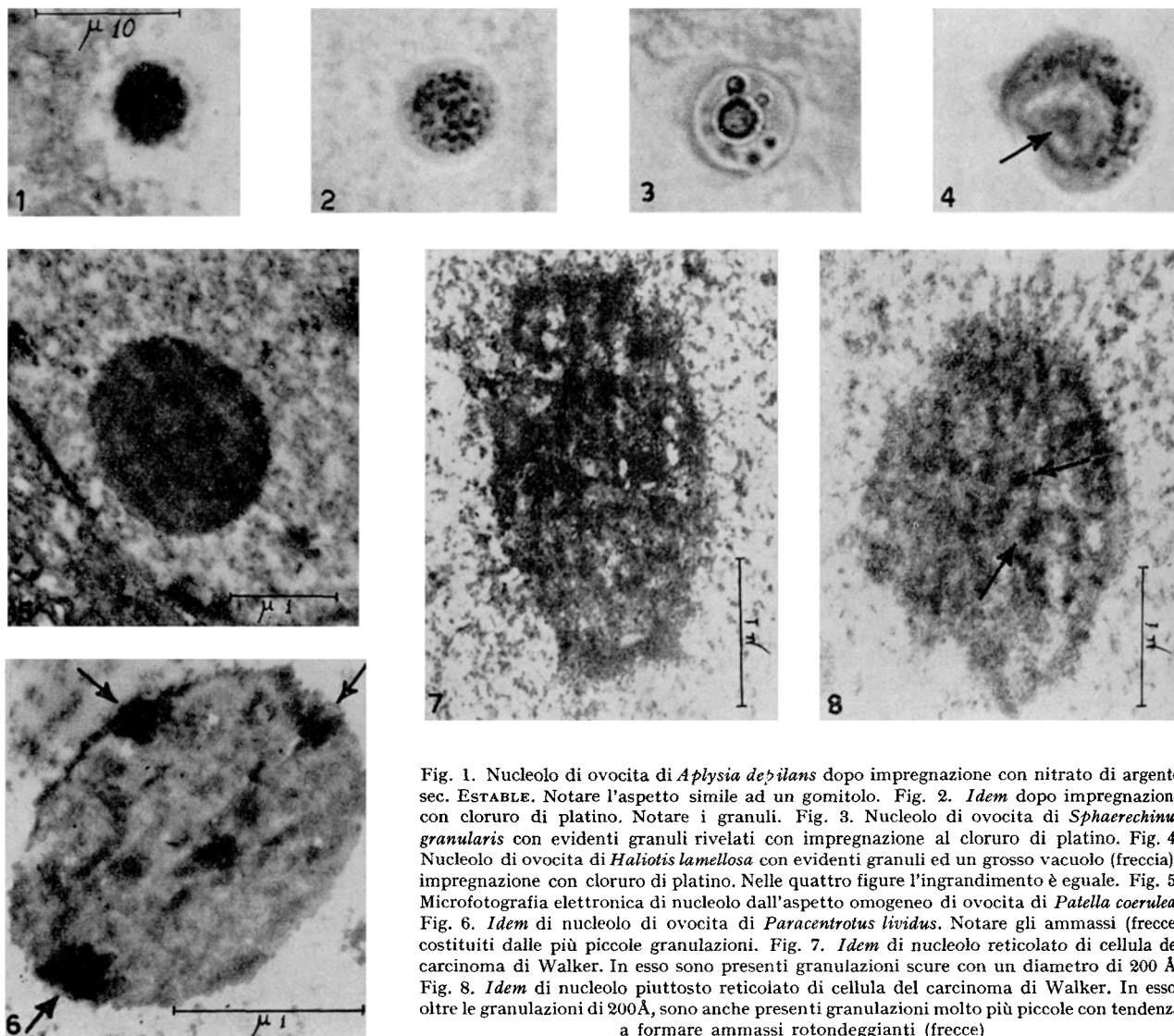


Fig. 1. Nucleolo di ovocita di *Aplysia depilans* dopo impregnazione con nitrato di argento sec. ESTABLE. Notare l'aspetto simile ad un gomito. Fig. 2. *Idem* dopo impregnazione con cloruro di platino. Notare i granuli. Fig. 3. Nucleolo di ovocita di *Sphaerechinus granularis* con evidenti granuli rivelati con impregnazione al cloruro di platino. Fig. 4. Nucleolo di ovocita di *Haliotis lamellosa* con evidenti granuli ed un grosso vacuolo (freccia); impregnazione con cloruro di platino. Nelle quattro figure l'ingrandimento è eguale. Fig. 5. Microfotografia elettronica di nucleolo dall'aspetto omogeneo di ovocita di *Patella coerulea*. Fig. 6. *Idem* di nucleolo di ovocita di *Paracentrotus lividus*. Notare gli ammassi (freccie) costituiti dalle più piccole granulazioni. Fig. 7. *Idem* di nucleolo reticolato di cellula del carcinoma di Walker. In esso sono presenti granulazioni scure con un diametro di 200 Å. Fig. 8. *Idem* di nucleolo piuttosto reticolato di cellula del carcinoma di Walker. In esso, oltre le granulazioni di 200 Å, sono anche presenti granulazioni molto più piccole con tendenza a formare ammassi rotondeggianti (freccie)

fin dal 1951 da BORYSKO e BANG¹⁴, per i quali a seconda del momento funzionale, si può avere ora l'aspetto omogeneo ora quello strutturato.

4) Oltre i suddetti aspetti, ne esiste un altro, in verità non tanto frequente, fatta eccezione per gli ovociti e le cellule dei tumori. Esso è dato da ammassi rotondeggianti molto scuri (Fig. 6) di varia dimensione, e distribuiti in punti diversi entro lo stesso nucleolo. Tutti i controlli eseguiti hanno permesso di stabilire che tali ammassi corrispondono ai granuli nucleolonemali⁷. Recenti ricerche¹⁵⁻¹⁷ compiute su cellule infettate con virus hanno permesso di osservare in alcuni nucleoli simili ammassi; rimane da risolvere se si tratta di particelle virali o di granuli nucleolonemali.

5) Dal punto di vista strettamente ultrastrutturale sia i nucleoli omogenei che quelli reticolati si compongono di granulazioni scure aventi per lo più un diametro di 150 Å (se ne sono misurati anche di 100 Å e di 200 Å), ciascuna delle quali circondata da un certo numero di elementi rotondi chiari aventi un diametro pressochè eguale. Il reticolo si costituisce in seguito ad un maggiore addensamento delle suddette granulazioni, secondo delle file variamente orientate e incrociatesi nei modi più diversi (Fig. 7). Gli ammassi scuri, come pure i loro collegamenti,

sono dati, invece, da granulazioni molto più piccole, con un diametro da 50 Å in giù. Molto di frequente, e specialmente negli ovociti in accrescimento e nei tumori, è possibile riscontrare, durante una fase più o meno lunga, la coesistenza dei due tipi di granulazioni (Fig. 8) con relative manifestazioni strutturali. Di esse quelle più grandi sono con ogni probabilità l'espressione di complessi macromolecolari di ribonucleoproteine. Quando esiste la cromatina associata (negli ovociti in genere nulla sta ad indicare la presenza^{7,18}), è possibile rinvenire lungo la superficie dei nucleoli dei sottilissimi filamenti spiralati, che sembrano prolungarsi per un certo tratto entro di essi.

¹⁴ E. BORYSKO and F. B. BANG, Bull. John Hopkins Hosp. 89, 468 (1951).

¹⁵ P. TOURNIER, F. CATHALA e W. BERNHARD, Pr. méd. 52, 1229 (1957).

¹⁶ W. BERNHARD, H. L. FEBVRE e R. CRAMER, C. R. Acad. Sci., Paris 249, 483 (1959).

¹⁷ R. DOORMASHKIN e W. BERNHARD, J. ultr. Res. 3, 11 (1959).

¹⁸ J. A. SERRA e A. QUEIROZ LOPES, Portug. Acta biol. [A] 1, 51 (1945).

¹⁹ A. BOLOGNARI, Nature 183, 1136 (1959).

In base ai fatti sopra riportati, quanto proposto da GONZALEZ-RAMIREZ per conciliare le diverse vedute sulle strutture del nucleolo, non è accettabile, e ciò specialmente tenuto conto della mutevolezza delle strutture e delle ultrastrutture, anche nell'ambito di uno stesso nucleolo in relazione ai vari momenti funzionali. In generale due principali funzionalità sono state riscontrate⁷, una relativa alle granulazioni più grandi, una a quelle più piccole, funzionalità che, specialmente negli ovociti mononucleolati, hanno la loro esplicazione rispettivamente nella fase iniziale e nella fase finale di tutto lo sviluppo ovocitario. In una specie (*Patella coerulea*) con ovociti polinucleolati le due funzionalità si esplicano in due tipi distinti di nucleolo: il nucleolo primario con granulazioni più grandi (di 150 Å di diametro) e senza granuli nucleolonemali, e gli anfinucleoli con granulazioni più piccole (da 15 a 50 Å di diametro) e con granuli nucleolonemali^{7,10}. Infine è bene far presente l'inopportunità di continuare a denominare nucleolonema il reticolo endonucleolare, che, come sopra detto, nulla ha a che vedere con la struttura che ESTABLE e SOTELO hanno erroneamente creduto di avere individuato.

Le osservazioni al microscopio elettronico, cui in parte si fa riferimento sopra, sono state compiute presso il Centro di Microscopia elettronica dell'Università di Padova.

A. BOLOGNARI

Istituto di Zoologia e di Anatomia comparata, Università di Messina (Italia), il 5 febbraio 1960.

Résumé

On donne certaines précisions en ce qui concerne le nucléolonema, qui en fait n'existe pas sous forme d'un peloton et qui ne correspond pas au réticule endonucleolaire décelé au microscope électronique. Dans le nucléole on peut reconnaître surtout deux formes d'éléments ultrastructuraux, c'est-à-dire les plus grandes granulacions (environ 150 Å de diamètre), qui peuvent donner lieu au réticule, et celles plus petites, dont les accumulations correspondent aux granules nucléolonémales. A ces types de granulacions il faut assigner deux rôles principaux.

Renal Tubular Transport of Sodium During Sodium Chloride and Sodium Bicarbonate Loadings in the Normal Dog

PITTS and LOTSPEICH¹ have demonstrated that bicarbonate reabsorption, expressed in mM/l of glomerular filtrate, remained constant when plasma bicarbonate concentration was increased above the threshold value of 26–28 mM/l by sodium bicarbonate infusion in the normal dog. No data have been published concerning the tubular reabsorption of sodium in experiments involving hypernatremia induced by $NaHCO_3$ loading. From current view on the $Na^+ \rightleftharpoons H^+$ exchange mechanism, one would anticipate the tubular reabsorption of sodium to remain similarly constant if plasma sodium concentration was increased by $NaHCO_3$ infusion.

Data obtained in $NaCl$ loading experiments concerning the influence of increases in sodium and chloride plasma concentrations on their tubular reabsorption are more conflicting. The studies of HARE and PHILIPS², and of BALDWIN, KAHANA, and CLARKE³, seem to demonstrate that sodium and chloride reabsorption rates by the tubules rise linearly with their plasma concentrations. On the

other hand, LEVY and ANKENY⁴, SELKURT and POST⁵, GREEN and FARAH⁶, and WESSON and ANSLOW⁷ did not observe such a relationship.

These discrepancies led us to reinvestigate sodium tubular reabsorption during hypernatremia induced by $NaCl$ and $NaHCO_3$ loadings in the normal dog.

Methods. The sodium salts were infused in isotonic or hypertonic solutions after the injection of suitable priming doses sufficient to induce frank sodium excretion (over 5.0 mM Na/l of glomerular filtrate). In 50 experiments plasma sodium concentration was maintained constant during 60–120 min by sustaining infusion of the sodium salt. In 11 experiments (5 with $NaHCO_3$ and 6 with $NaCl$) plasma sodium concentration was raised by 3 or 4 successive priming doses of sodium salt so that tubular reabsorption rate could be studied in the course of the same experiment at different plasma concentration levels.

1. *$NaHCO_3$ loading experiments.* 29 experiments were performed on 17 female dogs weighing between 12 and 28 kg. Sodium and bicarbonate reabsorption rates were calculated by the use of the exogenous creatinine clearance as a measure of the glomerular filtration rate (GFR). Hypernatremia was induced by priming doses of 150 to 250 mM $NaHCO_3$, and this state was further maintained by a sustaining infusion of isotonic $NaHCO_3$ (1.2–1.8 mM $NaHCO_3/min$). 134 anaerobic collection periods, ranging from 8–12 min, were secured during these experiments using the conventional clearance technique.

2. *$NaCl$ loading experiments.* 32 experiments were performed on 10 dogs weighing 13–27 kg. Sodium and chloride reabsorption rates were estimated as in $NaHCO_3$ experiments. Hypernatremia was induced by priming doses of 100–250 mM $NaCl$ followed by 1–2% $NaCl$ infusion (1.5–3.0 mM $NaCl/min$). 161 urine collection periods were obtained during these experiments.

Results. It has been repeatedly demonstrated^{7–10} that tubular reabsorption rates of sodium, chloride, and bicarbonate were markedly influenced by GFR changes. When GFR increases in the course of saline infusion, electrolyte tubular reabsorption rate rises proportionally so that transport rate values do not change when they are expressed in mM/l of glomerular filtrate. On the contrary, drops in GFR are not accompanied by changes in absolute tubular reabsorption rates. It follows that in such conditions tubular reabsorption rates increase when they are expressed in mM/l of glomerular filtrate.

The influence of GFR changes on the tubular reabsorption rates of the electrolytes made necessary the exclusion of some data from our results. We have deliberately omitted periods involving a drop of more than 5% in GFR in the course of a given experiment. The data to be presented are based on 295 urine collection periods.

¹ R. F. PITTS and W. D. LOTSPEICH, *Amer. J. Physiol.* **147**, 138 (1946).

² R. S. HARE and D. M. PHILIPS, *Amer. J. Physiol.* **140**, 334 (1943).

³ D. BALDWIN, E. M. KAHANA, and R. C. CLARKE, *Amer. J. Physiol.* **162**, 655 (1950).

⁴ M. N. LEVY and J. L. ANKENY, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y. **79**, 491 (1952).

⁵ E. E. SELKURT and R. S. POST, *Amer. J. Physiol.* **162**, 639 (1950).

⁶ D. M. GREEN and A. FARAH, *Amer. J. Physiol.* **158**, 444 (1949).

⁷ L. G. WESSON, JR. and W. P. ANSLOW, JR., *Amer. J. Physiol.* **180**, 237 (1955).

⁸ W. D. LOTSPEICH, R. C. SWAN, and R. F. PITTS, *Amer. J. Physiol.* **148**, 445 (1947).

⁹ D. D. THOMPSON and R. F. PITTS, *Amer. J. Physiol.* **168**, 490 (1952).

¹⁰ D. D. THOMPSON and M. J. BARRETT, *Amer. J. Physiol.* **176**, 201 (1954).