

To determine the extra-proteinic nitrogen, a similar series of experiments was carried out with the difference that the proteins were removed from the fluid by phenol (KIRBY¹⁹).

Results. The results obtained are presented in Table I for liver and Table II for kidneys.

The nitrogen content was determined also in the remaining fixatives, i.e. in formalin and alcohol. On the average, formalin contains 0.13 mg of N for 100 mg of liver tissue, alcohol —0.20 mg of N for 100 mg of liver tissue.

The method applied in the present work does not permit us to determine the content of DNA-nitrogen, because this remains in the phenol fraction. DNA eluted does not exceed 1% of fresh tissue weight, so that authors feel their assumption that total extra-proteinic nitrogen was determined to be justified.

Conclusions. 1. The quantity of proteins eluted from lyophilized material and controls is equal, differences noted being statistically insignificant. 2. The method of freeze-substitution is comparable as regards protein elution to lyophilization and controls. 3. The elution of proteins following chemical fixation, i.e. in formalin and

Caroy's fluid, is negligible, being lower than 1% of fresh tissue weight. The quantity of proteins eluted following absolute alcohol or acetone fixation may reach 2–3% of fresh tissue weight. Best reproducible results were obtained following acetone fixation. 4. No significant differences were found to exist between liver and kidney tissue.

Résumé. Les auteurs ont examiné l'influence de la fixation sur la solubilité des protéines. Le rein et le foie de rats blancs ont été fixés dans l'éthanol absolu, la formoline et l'acétone par lyophilisation et par la méthode de «freeze-substitution». Les protéines furent extraites par l'eau distillée et leur quantité déterminée par la micro-méthode de KJELDAHL. Un tableau résume les résultats obtenus.

K. OSTROWSKI, J. KOMENDER, and K. KWARECKI

Department of Histology and Embryology, Medical Academy, Warsaw (Poland), October 26, 1960.

¹⁹ K. S. KIRBY, *Biochem. J.* **64**, 405 (1956).

Histochemical Analysis of Three Dehydrogenase Systems in the Renal Adenocarcinoma of the Frog *Rana pipiens*

Recently we studied three dehydrogenase systems in the renal adenocarcinoma of the oviparous Toothcarp *Aplocheilichthys lineatus*¹. To establish whether a more general significance should be attached to the results obtained, it seemed desirable to us to perform a corresponding investigation with another lower vertebrates. As experimental material, we chose the renal adenocarcinoma in the frog *Rana pipiens*², of which 18 males and 26 females were available. Histologically, the tumours, involving one or both kidneys, consisted of atypical cells usually much larger and basophilic than normal kidney cells and of a scanty, poorly vascular stroma. The epithelial tumour cells which can form irregular acinar or tubular structures, sometimes show intranuclear inclusions because the chromatin is condensed about the periphery of the nucleus and is separated from the large central acidophilic inclusion by a clean space. No capsule is present and, even in very small tumours, marginal extensions of tumour tissue infiltrate the surrounding tissues. Mitoses are frequently found. Metastasis is not uncommon, especially in the lungs and liver.

This tumour was studied histochemically for the three dehydrogenase systems, namely succinic diphosphopyridine nucleotide (DPN) and triphosphopyridine nucleotide (TPN) diaphorases and the DPN-dependent enzymes: lactic, malic, glutamic, β -hydroxybutyric, and ethanolic dehydrogenases^{3–6}. To demonstrate mitochondria some sections were also processed with Regaud's stain⁷. In general, for morphological orientation, parallel sections were stained with haematoxylin and eosin or thionin.

As in *Aplocheilichthys lineatus*¹, also in the tumour tissue of *Rana pipiens* the succinic dehydrogenase activity was low as compared to normal tissues. This enzyme appeared to be linked to the mitochondria and cell membranes. Tumour cells undergoing necrotic changes were inactive or very nearly so, but the intraluminal material revealed a marked enzymatic activity, which was due either to persistent organelles of disintegrating desquamated tumour cells or, which is less likely, to the presence of the enzyme system in the tumour cell secretion.

The DPN diaphorase activity was high, however, similar to that in the most intensely stained normal cells. The DPN diaphorase and the DPN-linked dehydrogenases appeared to be linked to the mitochondria and some cell membranes. The TPN diaphorase activity was observed to be much lower than the DPN diaphorase activity showing a more finely and widely dispersed intracytoplasmic distribution, which is suggestive of the presence of microsomes, and displayed a high concentration in the cell membranes. The glutamic and particularly the ethanolic dehydrogenase activities were only weak in the tumour

Distribution of succinic dehydrogenase, DPN and TPN diaphorases and several DPN-linked dehydrogenases in the renal adenocarcinoma of the frog *Rana pipiens*. The enzymatic activity was rated histologically on the basis of colour reaction as 0 to 4 by inspection of the tumour cells.

Succinic dehydrogenase	1
DPN diaphorase	4
TPN diaphorase	2
Lactic dehydrogenase ^a	4
Malic dehydrogenase ^a	2
Glutamic dehydrogenase ^a	1
β -hydroxybutyric dehydrogenase ^a	2
Ethanolic dehydrogenase ^a	0

^a DPN-linked dehydrogenases

¹ A. STOLK, *Naturwiss.* **47**, 188 (1960); *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.*, Amsterdam **63**, 548, 567 (1960).

² B. LUCKÉ, *Amer. J. Cancer* **20**, 352 (1934); **22**, 326 (1934); **34**, 15 (1938); *J. exp. Med.* **68**, 457 (1938); **70**, 269 (1939); **70**, 257 (1939); **72**, 311 (1940); **72**, 321 (1940); **89**, 269 (1949).—H. G. SCHLUMBERGER and B. LUCKÉ, *Cancer Res.* **8**, 657 (1948).

³ A. M. SELIGMAN and A. M. RUTENBURG, *Science* **113**, 317 (1951).

⁴ K. C. TSO, C. S. CHENG, M. M. NACHLAS, and A. M. SELIGMAN, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 6139 (1956).

⁵ M. M. NACHLAS et al., *J. Histochem.* **5**, 420 (1957); *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 467, pl. 223 (1958); **29**, pl. 11 (1958).

⁶ B. MONIS, M. M. NACHLAS, and A. M. SELIGMAN, *Cancer* **12**, 1238 (1959).

⁷ R. D. LILLIE, *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*, 2nd Ed. (The Blakiston Company, Inc., New York 1954), p. 185.

tissue, while the lactic, malic and β -hydroxybutyric dehydrogenase activities were quite high. The neoplastic tissue appeared to be poorer in ethanolic dehydrogenase than most of the normal tissues. The lactic dehydrogenase was more active than the malic dehydrogenase. As these results, which are given in the Table, generally correspond very well with those obtained with some human tumours⁶ and the renal adenocarcinoma of *Aplocheilus lineatus*¹, they must undoubtedly be regarded to be of more general significance.

Zusammenfassung. Drei Dehydrogenase-Systeme (Succinodehydrogenase, DPN- und TPN-Dehydrogenase sowie einige DPN-Dehydrogenase-ähnliche Dehydrogenasen wie die auf Milchsäure, Malonsäure, Glutaminsäure, β -

Hydroxybuttersäure sowie Äthanol wirkenden substratspezifischen Dehydrogenasen) wurden am Adenocarcinom der Froschniere einer histochemischen Analyse unterzogen.

Die Enzymaktivität war für die DPN- und die Milchsäure-Dehydrogenase sehr hoch; eine mittlere Aktivität zeigten die TPN-, die Malonsäure- und die β -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase. Sehr gering war die Reaktion für die Succino- sowie die Glutaminsäure-Dehydrogenase, während sie für die Äthanol-Dehydrogenase negativ ausfiel.

A. STOLK

Department of Histology, Free University, Amsterdam (The Netherlands), December 2, 1960.

Die papierelektrophoretische Auftrennung von Phosphoarginin und Arginin

Zur rascheren und deutlicheren Auftrennung phosphorhaltiger Guanidinderivate wurde vergleichend zur papierchromatographischen¹ die papierelektrophoretische Auftrennung angewandt. Untersucht wurden saures², aus Hummern isoliertes Phosphoarginin³, basisches Arginin⁴, sowie hydrolysiertes Phosphoarginin⁵ (pH 1,0, 100°C, 1 min). Die papierelektrophoretische Auftrennung war schon nach 1 h bei einer Stromstärke von 0,5 mA/cm (Veronalpuffer: pH 8,6; u 0,1) bei 20°C möglich. Nach Trocknung der Streifen (105°C, 15 min) wurden zur Darstellung der monosubstituierten Guanidine Sakaguchi Reagens⁶ und zu der der Phosphorsäure Molybdänsäure⁷ als Entwickler verwendet. In der Figur werden die Ergebnisse für Streifen mit Phosphoarginin, Arginin, hydrolysiertem Phosphoarginin, sowie für ein Gemisch aus Phosphoarginin und Arginin wiedergegeben.

Summary. A paper electrophoretic separation method for phosphoarginin and arginin is described.

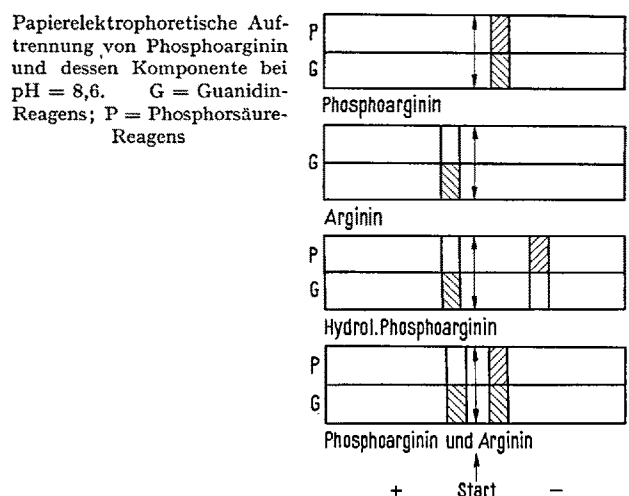
W. THORSELL und E. LIENERT

Chemisches Institut, Tierärztliche Hochschule, Stockholm (Schweden), und Pharmakologisches Institut, Tierärztliche Hochschule, Wien (Österreich), 5. Dezember 1960.

Elektroretinogramm und Netzhautstruktur der Sumpfohreule (*Asio flammeus*)

Aus vergleichenden Untersuchungen ist bekannt, dass die Netzhäute ausgesprochener Tages- bzw. Dämmerungstiere strukturelle und funktionelle Besonderheiten aufweisen, welche die Unterscheidung eines photopischen bzw. skotopischen Systems ermöglichen. Im Anschluss an eine bei Säugern (Ziesel und Meerschweinchen) durchgeführte Studie¹ wurde nunmehr mit gleicher Methodik das ERG eines typischen Nachtvogels (*Asio flammeus flammeus*) untersucht und mit dem bereits bekannten ERG eines Tagvogels (Tauben)² verglichen. Die Struktur der untersuchten Netzhäute wurde histologisch kontrolliert.

Die Tiere (1 Sumpfohreule, 3 Tauben) befanden sich in Urethannarkose (1,5–2,0 g/kg) und waren sorgfältig vor Auskühlung geschützt. Die Lichtreize (Einzel-, Doppel- und Flimmerlichtblitze) wurden mit einem elektronischen



¹ G. E. HOBSON und K. R. REES, Biochem. J. 61, 549 (1955).

² A. H. ENNOR, J. F. MORRISON und H. ROSENBERG, Biochem. J. 62, 358 (1956).

³ A. H. ENNOR und J. F. MORRISON, Physiol. Rev. 38, 638 (1958).

⁴ The Merck Index of Chemicals and Drugs, 7th Ed. (1960), p. 98.

⁵ LKB-Produkte: Paper Electrophoresis Equipment (1959).

⁶ R. ACHER und C. CROCKER, Biochem. biophys. Acta 9, 704 (1952).

⁷ S. BURROWS, F. S. M. GRYLLS und J. S. HARRISON, Nature 170, 800 (1952).

Lichtstimulator (Grass PS-1) erzeugt. Die in lux angegebenen Reizintensitäten (weisses Licht, Xenon-Gasentladungslampe) beziehen sich auf die Beleuchtungsstärke in der Eintrittspupille (Reizfeld: 13 cm Ø, 30 cm vor dem Auge; Reizdauer etwa 10 µsec). Die Registrierung des ERG erfolgte mittels Pt-Cornealektrode, RC-Verstärker (Zeitkonstante 0,3 sec), Kathodenstrahloszillographen und Camera. Zur histologischen Untersuchung wurden die Tiere mit Zenkerscher Lösung vitalfixiert und die hinteren Bulbusschalen in Paraffin oder nach der heissen Celloidin-Methode eingebettet.

Das Einzelblitz-ERG der Eule unterscheidet sich von jenem der Taube durch eine niedrigere Schwelle sowie vor allem durch einen wesentlich langsameren Verlauf

¹ H. BORNSCHEIN und GY. SZEGVÁRI, Z. Biol. 110, 285 (1958).

² E. DODT und A. WIRTH, Acta physiol. scand. 30, 80 (1953).