

Fig. 1. Sites of UDPG dehydrogenase activity in rat liver epithelium. $\times 960$.

The histochemical demonstration of sites of DPN reduction is achieved by the transfer of hydrogen from reduced coenzyme to tetrazolium salt (hydrogen acceptor) by a flavoprotein separate from the dehydrogenase. Although in sections of tissues where UDPG dehydrogenase has been shown to occur, an abundance of DPNH-tetrazolium reductase can be demonstrated to be present, tetrazole was inefficient as sole hydrogen acceptor in a system involving the oxidation of UDPG. It was found necessary to introduce a quinone (2-methyl-1:4-naphthoquinone, menadione) as intermediate electron carrier to tetrazolium. Apparently, endogenous tetrazolium reductase does not react sufficiently with DPNH generated by soluble³ UDPG dehydrogenase. In this case, hydrogen transfer to tetrazole is better accomplished by a quinone-reductase system which is highly active in the cytoplasmic (i.e. microsomal and soluble) fractions⁵. Coating of sections with purified bacterial diaphorase did not improve the histochemical reaction. Phenazine methosulfate could not substitute for menadione as electron carrier.

Fresh sections from blocks of rat or mouse tissue, quenched in liquid oxygen, were cut at 5 μ on a cryostat and incubated at 37° for 30 min in a medium containing: UDPG (from yeast), $5 \times 10^{-4} M$; DPN, $3 \times 10^{-3} M$; menadione, $2 \times 10^{-5} M$; 3,5-diphenyl-2-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl) tetrazolium (MTT), $1 \times 10^{-3} M$; CoCl₂, $2.4 \times 10^{-3} M$; trishydroxymethyl aminomethane-HCl buffer, 0.1 M, pH 7.4; bovine serum albumin 1% (w/v). Control sections were incubated in medium lacking substrate.

Strong UDPG dehydrogenase activity was found in liver epithelium (Figure 1) and in the proximal tubular cells of kidney (Figure 2). Weak activity could be demonstrated in heart muscle fibres, in fibrocytes, and in cells of hyaline cartilage. Both skeletal muscle and intestinal epithelium were inactive. In contrast to liver cells of adult animals, no UDPG dehydrogenase activity was found in foetal liver. Low levels of both UDPGA and uridine diphosphate-trans-glucuronylase in foetal liver homogenate has been described by DUTTON⁶.

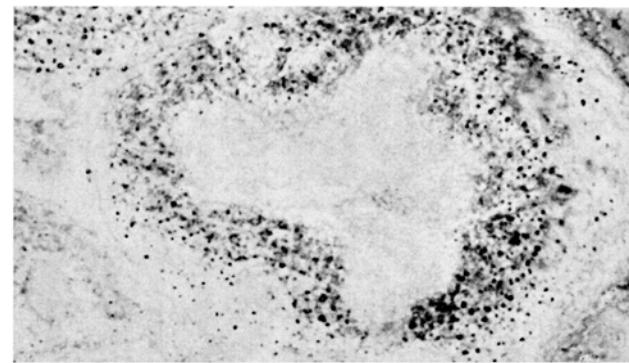


Fig. 2. UDPG dehydrogenase activity in proximal tubule of rat kidney. No reaction in distal tubule (bottom). $\times 960$.

In the presence of both menadione and oxidized coenzyme, the 'nothing dehydrogenase' effect^{7,8} was pronounced even at pH 7.4. This effect necessitated the use of a suboptimal pH³ for the histochemical reaction and it was essential to compare the results to non-substrate controls. Suboptimal conditions may be responsible for our failure to demonstrate UDPG dehydrogenase in certain sites where the enzyme can be assumed to be present as, for instance, in gastric mucosa⁹.

Except for liver, a histochemical survey of various organs of the rat failed to establish a positive relationship between UDPG dehydrogenase and β -glucuronidase activity. At present, therefore, the hepatic parenchyma is the only structure for which histochemical evidence of a 'UDP-cycle'¹⁰ is available.

Zusammenfassung. Es wird eine Methode zur histochemicalen Lokalisation der Aktivität von DPN-spezifischer UDPG-Dehydrogenase beschrieben. Das Wasserstoff übertragende System vom reduzierten Coenzym zu N-Thiazol-substituiertem Monotetrazol (Reduktionsindikator) bestand in der endogenen Menadionreduktase. Stärkste UDPG-Dehydrogenaseaktivität fand sich in Leberepithelien und proximalen Nierentubuli ausgewachsener Tiere (Ratte, Maus).

R. HESS and A. G. E. PEARSE

Department of Pathology, Postgraduate Medical School, London (England), March 16, 1961.

- ⁴ E. S. MAXWELL, H. M. KALCKAR, and J. L. STROMINGER, Arch. Biochem. Biophys. 65, 2 (1956).
- ⁵ R. HESS and A. G. E. PEARSE, Nature, in press (1961).
- ⁶ G. J. DUTTON, Biochem. J. 71, 141 (1959).
- ⁷ E. RACKER, Physiol. Rev. 35, 1 (1955).
- ⁸ H. ZIMMERMANN and A. G. E. PEARSE, J. Histochem. Cytochem. 7, 271 (1959).
- ⁹ G. J. DUTTON and I. H. STEVENSON, Biochim. biophys. Acta 31, 568 (1959).
- ¹⁰ H. M. KALCKAR and E. S. MAXWELL, Physiol. Rev. 38, 77 (1958).

Erythropoese bei bilateral nephrektomierten Kaninchen¹

Es wird heute übereinstimmend angenommen, dass die Erythrozytenproduktion durch einen Plasmafaktor, Erythropoetin genannt, stimuliert wird. Der Ort der Erythropoetinbildung ist nicht sicher bekannt. Aus klinischen Beobachtungen der letzten Jahre sowie aus tierexperimentellen Untersuchungen wurde gefolgert, dass die Niere

die Bildungsstätte eines erythropoetisch hochwirksamen Prinzips sein müsse. So fand man, dass bei Patienten mit bestimmten schweren Nierenerkrankungen wie Hypernephrom, Nierencarcinom, Hydronephrose, Cystenniere, gleichzeitig eine Polyzythämie bestand, die gelegentlich nach Entfernung der erkrankten Niere wieder verschwand.

¹ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Kaninchen Nr.	% Erythroblasten im Knochenmark Tage nach Nephrektomie											Rest-N (mg%) am letzten Tag
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	41,1											154
2	29,1											145
3	55,3											—
4		26,2										—
5		34,8										156
6		44,9										198
7			42,3									—
8				48,5								252
9				40,8								177
10				41,1								140
11				33,9								305
12					50,5							195
13					46,1							267
14						40,0						295
15						35,0						270
16						53,0						186
17							53,1					305
18								37,4				368
19								41,4				398
20									40,3			281
21										57,7		133

Andererseits zeigten Patienten mit akutem Nierenversagen eine hochgradige Erythroblastopenie.

In überzeugenden Untersuchungen konnte NAETS^{2,3} nachweisen, dass es beim Hund nach bilateraler Nephrektomie, jedoch nicht nach bilateraler Ureterenligatur, zum Verschwinden des erythropoetisch wirksamen Faktors im Plasma und einer völligen Aplasie der erythroblastischen Reihe im Knochenmark kommt. In beiden Gruppen der urämischen Tiere waren die Rest-N-Werte im Serum gleich stark erhöht. Bereits in den ersten Tagen nach der Entfernung der zweiten Niere war die Zahl der Erythroblasten im Knochenmark auf 2-4% vermindert, und vom 5. Tage an liessen sich keine Erythroblasten mehr nachweisen.

Im Gegensatz dazu folgerte ERSLEV⁴ aus seinen Versuchen an bilateral nephrektomierten Kaninchen, dass die sich entwickelnde Anämie in erster Linie auf die gestörte Stoffwechselleage mit hochgradiger Retention harnpflichtiger Substanzen, weniger auf die Gegenwart oder Abwesenheit von Nierengewebe zurückzuführen ist. Eigene, seit dem Jahre 1958 unternommene und noch nicht veröffentlichte Untersuchungen bei insgesamt 51 doppelseitig nephrektomierten Kaninchen, führten zu einer ähnlichen Auffassung.

Zur Untersuchung verwendeten wir erwachsene männliche und weibliche Kaninchen. Die Operation erfolgte in Allgemeinnarkose (Evipan-Na), wobei beide Nieren gleichzeitig entfernt wurden. Unmittelbar vor der Nephrektomie wurde ein Aderlass vorgenommen (ca. 13 ml/kg Körpergewicht). Um einen hypovolämischen Kollaps zu vermeiden, erfolgte anschliessend eine Injektion von Dextran (6%ig) in adäquaten Volumina. Vom 2. Tag an wurde täglich eine intraperitoneale Dialyse mit der von MERRILL⁵ angegebenen Lösung durchgeführt. Die spontane Nahrungsaufnahme der Tiere war sehr gering und hörte am 4. Tag meist völlig auf. Zur Deckung des Flüssigkeitsminimums erhielten die Kaninchen pro Tag 60-80 ml Flüssigkeit, teils intravenös, teils *per os*. Nach dem Tode wurde der Femur sofort *in toto* entfernt und nach Eröffnung der Markhöhle Tupfpräparate aus dem Bereich der Metaphyse und beider Epiphysen angefertigt. Es wurden

jeweils mindestens 800, meist 1200 kernhaltige Zellen ausgezählt und der Anteil der Erythroblasten in % angegeben. In der Tabelle wurden die entsprechenden Ergebnisse von 21 Kaninchen, die unter weitgehend einheitlichen Versuchsbedingungen standen, wiedergegeben. Die übrigen hämatologischen Befunde, die Ergebnisse des ⁵⁹Fe-Einbaues in Erythroblasten sowie die festgestellten Serum-elektrolytveränderungen werden an anderer Stelle ausführlich mitgeteilt.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, kam es bei keinem der nierenlosen Tiere zu einer Erythroblastopenie. Der Durchschnittswert der Erythroblasten im Knochenmark dieser 21 nephrektomierten Kaninchen betrug 42,5% (Standardabweichung = 8,4%) und lag somit im Mittel höher als der Durchschnittswert bei 10 normalen Tieren (35,8%, Standardabweichung 10,4%). Bei einem am 11. Tage nach bilateraler Nephrektomie getöteten Tier fand sich eine Erythroblastose von 57,7%.

Unsere Versuche zeigen eindeutig, dass die Erythroblastenproduktion im Kaninchenknochenmark auch in Abwesenheit von Nierengewebe erfolgt. Die Nieren können beim Kaninchen somit nicht die wesentliche, jedenfalls nicht die einzige Bildungsstelle eines erythropoetisch wirksamen Stoffes sein.

Summary. Our experiments with bilaterally nephrectomized rabbits, in contrast to experiments of other authors with dogs, demonstrated that the production of erythroblasts in the bone marrow in the absence of kidney tissues not only continues but that it can also be augmented following bleeding.

J. FISCHER und L. FRIEDERICI

Medizinische Poliklinik der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (Deutschland), 28. April 1961.

² J. P. NAETS, Exper. 14, 74 (1958).

³ J. P. NAETS, J. clin. Invest. 39, 102 (1960).

⁴ A. J. ERSLEV, Arch. int. Med. 101, 407 (1958).

⁵ J. P. MERRILL, *The Treatment of Renal Failure* (Grune & Stratton, New York and London 1955).