

2-days explants were inoculated with 0.5 ml undiluted Type I poliovirus (Mahoney strain) exhibiting a titer of 8.6 ID<sub>50</sub>/ml. Direct adsorption of the virus was allowed for 30 min. The unadsorbed inoculum was decanted, the cells were washed 3 times with physiological salt solution (PBS) and incubated with complete medium, containing 1.5 µg colchicine / 1.5 ml. Controls were inoculated with pseudo-inoculum containing no virus<sup>3</sup>. 40 tube cultures were used for an experiment, 20 were inoculated with virus, 20 served as uninoculated controls, without colchicine, to compare virus production in un-medicated HeLa cells. Coverslip cultures were processed by vital staining, or the usual histological techniques at various time intervals. The cytological findings will be reported separately. The supernatant media of the infected cell cultures, exhibiting 3 to 4 + cytopathic effect, were pooled 24 h after infection. Titration of the two infected groups was carried out on tube cultures of HeLa cells. The virus production is illustrated in the Table.

The results of two assays are tabulated for each group. Both the colchicine treated and untreated systems produced large amount of poliovirus. The titers, in con-

trast to previous experiments in Maitland cultures of Rhesus kidney cortex<sup>1</sup>, were high. There was about the same or even higher virus growth in the presence of colchicine as in untreated cultures. The difference, however, was within the error of the titration techniques used.

The findings described are of some importance. They suggest that the biochemical set-up of the mitosis may be selectively inhibited, without interfering with the synthesis of an RNA virus. Especially the spindle formation, the point of attack of colchicine, is fully independent from processes leading to the propagation of polio-virus. Thus not all the physiological functions of a cell are necessary for the biosynthesis of a virus, but there is certain selectivity in this phenomenon.

Systematic exploration of the behaviour of DNA-containing viruses in regard to colchicine treatment is planned, together with pertinent biochemical studies.

**Zusammenfassung.** Die Vermehrung des Poliovirus in HeLa Zellen war in Gegenwart oder Abwesenheit starker Colchicindosen gleich hoch. Die biochemischen Prozesse bei der Spindelbildung sind scheinbar unabhängig von denen der Biosynthese eines RNA-Virus.

E. Kovács

Deutsche Forschungsanstalt für Psychiatrie, Max-Planck-Institut, München (Germany), September 12, 1961.

Materials	Repeated titrations <sup>a</sup>	Virus growth <sup>b</sup> in presence in absence of colchicine	
Pooled supernatant of 10 HeLa cell tube cultures	Assay 1	7.60	7.75
Same as above	Assay 2	8.25	8.20

<sup>a</sup> On tube cultures of HeLa cells. <sup>b</sup>Titers as negat. logarithms ID<sub>50</sub>/ml.

### Aktivitätsänderungen der Lactatdehydrogenase im Mäuseplasma durch Beimpfung mit virushaltigen Geschwulstfiltraten oder virushaltigen Gewebekulturen<sup>1</sup>

Durch tierexperimentelle und elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde gesichert, dass in einigen Impfgeschwülsten der Maus virusartige Körper enthalten sind, die bei neugeborenen Mäusen myeloische Leukämien verursachen<sup>2,3</sup>. Während der monatelangen Latenzzeit bis zur Entwicklung der Leukämien gibt es praktisch keine Nachweismöglichkeiten des Virus oder seiner Infektionsfolgen. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von Bedeutung, in denen auffallende Erhöhungen der Fermentaktivität von Lactatdehydrogenase (LDH) nach Injektion von Geschwulstfiltraten berichtet wird<sup>4</sup>; die Autoren wurden durch ihre Ergebnisse veranlasst, ein übertragbares Agens in den untersuchten Geschwülsten anzunehmen.

Aus einer der Leukämien, die wir durch virushaltige Geschwulstfiltrate des Mäuseimpftumors Sa I erzeugt haben, konnten wir, ähnlich anderen Autoren<sup>5,6</sup>, ein Virus *in vitro* isolieren und züchten<sup>7</sup>. Es lag deshalb nahe, die Wirkung beider virushaltiger Extrakte, der leukämogenen Geschwulstfiltrate und der Kulturflüssigkeiten des *in vitro* gehaltenen Virus, auf die Aktivität der Plasma-LDH zu untersuchen.

**Methodik.** Vom Tier wurden Viruslösungen durch Herstellung zellfreier Filtrate aus dem Mäuseascitestumor

Sa I, wie früher angegeben, gewonnen<sup>8</sup>. Aus virushaltigen Suspensionskulturen von L-Zellen wurden auf dem Höhepunkt der cytopathogenen Veränderungen Zellhomogenate hergestellt und deren Überstand nach Zentrifugierung bei 1560 g für 20 min verwendet. Aus normalen virusfreien Kulturen von L-Zellen wurden ebensolche Homogenatüberstände für Kontrollversuche hergestellt. 3 Versuchsgruppen ausgewachsener Händermäuse wurden mit jeweils 0,2–0,5 ml einer der Lösungen intraperitoneal beimpft. 48–72 h nach Beimpfung erfolgte die Blutentnahme teils durch Herzpunktion, teils durch Orbitalentnahme. Im abzentrifugierten Plasma wurde die LDH-Aktivität durch den DPN-H-Test im UV-Spektrophotometer (Eppendorf) gemessen und in Einheiten nach Bücher berechnet (Tabelle).

Es fand sich eine Erhöhung der LDH-Werte nach Gaben von Geschwulstfiltraten auf das 3fache der Norm im

<sup>1</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

<sup>2</sup> A. GRAFFI, Fortschr. exp. Tumorforsch. 1, 112 (1960).

<sup>3</sup> A. GEORGI, Beitr. path. Anat. 124, 183 (1961).

<sup>4</sup> V. RILEY, L. FRANK, E. HUERTO und D. BARDELL, Science 132, 545 (1960).

<sup>5</sup> S. E. STEWART, B. E. EDDY und N. BORGESSE, J. Nat. Cancer Inst. 20, 1223 (1958).

<sup>6</sup> A. GRAFFI, J. GIMMY und L. KRAUSE, Naturwissenschaften 46, 330 (1959).

<sup>7</sup> A. GEORGI, M. JÄGER und K. PRECHTEL, Naturwissenschaften 48, 740 (1961).

Mittelwert. Nach Injektion virushaltiger Zellhomogenate mit nachgewiesenem cytopathogenem Effekt erfolgte eine Erhöhung der LDH-Aktivität auf mehr als das Doppelte. Hier streuten die Werte etwas stärker, was aus den unterschiedlich stark ausgeprägten cytopathogenen Veränderungen der verwendeten Zellkulturen zu verstehen ist. Kontrolluntersuchungen mit normalen, nicht virushaltigen Zellhomogenaten ergaben keine Änderung der Fermentaktivitäten. Alle gefundenen Werte sind statistisch gesichert und hoch signifikant (Tabelle mit Angabe des mittleren Fehlers des Mittelwertes).

In weiteren noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen über den Verlauf und die Dauer des LDH-Anstieges fand sich folgendes: 24 h nach Beimpfung ist die Aktivität normal; sie steigt dann kontinuierlich an und erreicht am 4. Tag mit 265 E den 6–7fachen Normwert. Die vorläufigen Ergebnisse zeigen weiter, dass die Aktivität bis zum 15. Tag nach Beimpfung in dieser Höhe konstant bleibt.

Die gleichen Veränderungen finden sich nach Injektion zellfreier Organhomogenate der genannten tumorträgernden Mäuse. Alle Werte stützen sich auf wenigstens 10 Einzelwerte und sind hoch signifikant. Auch bei Untersuchung 9–12 Monate alter Tiere, die als Neugeborene mit dem virushaltigen Geschwulstfiltrat beimpft wurden und sich in der Latenzperiode vor der Leukämienmanifestation befinden, konnten wir die gleiche signifikante Erhöhung der LDH-Aktivität feststellen.

Wir schliessen aus diesen Ergebnissen, dass ein Virus die auffallende permanente LDH-Erhöhung verursacht.

Die Ergebnisse mit dem *in vitro* gehaltenen Virus bekräftigen diese Vorstellung. Die geringere Aktivitätssteigerung der LDH nach virushaltigen Kulturflüssigkeiten kann durch eine Inkonstanz der Virusfreisetzung *in vitro* erklärt werden, auf die wir früher hingewiesen haben<sup>7</sup>. Es ist weiter zu prüfen, ob der LDH-Test ein Gradmesser für den Virusgehalt in Kulturen mit isolierten Leukämieviren ist.

LDH-Aktivität im Plasma bis zu 72 h nach Gaben virushaltiger Lösungen (Rubrik II und III) im Vergleich zu virusfreien Lösungen (Rubrik IV) und Normalwerten (Rubrik I).

I	II	III	IV
Normalwerte ausgewachsener Mäuse (15 Tiere)	Geschwulstfiltrate aus Sa I (22 Tiere)	Virusinfizierte L-Zellen (12 Tiere)	Normale L-Zellen (14 Tiere)
40,81 (2,25) <sup>a</sup>	122,1 (9,51) <sup>a</sup>	93 (11,6) <sup>a</sup>	43,5 (12,4) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Mittlerer Fehler des Mittelwertes = GM in Klammern

### Flavonoide aus *Vitex agnus castus* L.

Kürzlich berichteten BELIC, BERGANT-DOLAR und MORTON<sup>1</sup> über die Isolierung einer bisher unbekannten Variante der Flavonoidreihe (5,3'-Dihydroxy-3,6,7,4'-tetramethoxyflavon), die sie Casticin nennen. Bei der Fortführung früherer Arbeiten<sup>2</sup> über die Inhaltsstoffe von *Vitex agnus castus* sind wir ebenfalls auf diesen Inhaltsstoff gestossen und zu den gleichen Ergebnissen gelangt<sup>3</sup>. In seiner Verbreitung beschränkt sich das Casticin nicht nur auf die Früchte von *Vitex agnus castus*; in den Blättern der zu den «Terminales» gerechneten Vitex-Arten *V. agnus castus*, *V. trifolia* und *V. negundo* wurde es auch gefunden. Aus dem Chloroformextrakt der Blätter lässt sich Casticin leicht durch Schütteln mit 5%iger Natronlauge in die wässrige Phase bringen; nach dem Ansäuern mit verdünnter Salzsäure scheiden sich nach einigen Stunden lange, blassgelbe Kristallnadeln des Flavons ab. Umkristallisation der Kristalle aus Methanol führt zu gelben Prismen (Smp. 188–189°). Eigentümlicherweise liegt das Casticin auch in den Blättern als Aglykon vor, während zwei weitere Nebenflavone in glykosidischer Bindung vorkommen. Das eine Begleitflavon ( $C_{21}H_{20}O_{11}$ ; Smp. 258°; UV-Spektrum: Maxima bei  $\lambda$  258 m $\mu$  [ $\epsilon_{\text{spez.}} = 41,6$ ] und bei  $\lambda$  350 m $\mu$  [ $\epsilon_{\text{spez.}} = 47,2$ ]) steht noch aus, wahrscheinlich handelt es sich um das *D*-Glukosid eines Tetrahydroxy-monomethoxy-flavons.

### Studies on the Antibody Content of Anacid Gastric Juices

In our previous investigations it was observed that the *Coli bacilli* are living in the juices of the stomach, duodenum, jejunum and ileum of achlorhydric humans in an

gen Ergebnisse zeigen weiter, dass die Aktivität bis zum 15. Tag nach Beimpfung in dieser Höhe konstant bleibt. Die gleichen Veränderungen finden sich nach Injektion zellfreier Organhomogenate der genannten tumorträgernden Mäuse. Alle Werte stützen sich auf wenigstens 10 Einzelwerte und sind hoch signifikant. Auch bei Untersuchung 9–12 Monate alter Tiere, die als Neugeborene mit dem virushaltigen Geschwulstfiltrat beimpft wurden und sich in der Latenzperiode vor der Leukämienmanifestation befinden, konnten wir die gleiche signifikante Erhöhung der LDH-Aktivität feststellen.

Wir schliessen aus diesen Ergebnissen, dass ein Virus die auffallende permanente LDH-Erhöhung verursacht. Die Ergebnisse mit dem *in vitro* gehaltenen Virus bekräftigen diese Vorstellung. Die geringere Aktivitätssteigerung der LDH nach virushaltigen Kulturflüssigkeiten kann durch eine Inkonstanz der Virusfreisetzung *in vitro* erklärt werden, auf die wir früher hingewiesen haben<sup>7</sup>. Es ist weiter zu prüfen, ob der LDH-Test ein Gradmesser für den Virusgehalt in Kulturen mit isolierten Leukämieviren ist.

**Summary.** Inoculation of adult mice with filtrates of ascites-tumor Sa I and extracts of virus-inoculated tissue-cultures of strain L-cells causes a significant and permanent increase of LDH in plasma of animals.

A. GEORGII, M. JÄGER, H. KROTH und H. BAYERLE

Pathologisches Institut der Universität München (Deutschland), 29. September 1961.

stitution des anderen ( $C_{22}H_{24}O_{12}$ ; Smp. 245°; UV-Spektrum: Maxima bei  $\lambda$  258 m $\mu$  [ $\epsilon_{\text{spez.}} = 41,6$ ] und bei  $\lambda$  350 m $\mu$  [ $\epsilon_{\text{spez.}} = 47,2$ ]) steht noch aus, wahrscheinlich handelt es sich um das *D*-Glukosid eines Tetrahydroxy-monomethoxy-flavons.

**Summary.** Leaves of *Vitex agnus castus* L. and of related species which are said to have hormonelike activities contain three flavonoids: casticin and luteolin-7-*D*-glucoside and a *D*-glucoside of an unknown 5-hydroxy-flavone derivative.

M. SIRAIT, H. RIMPLER und R. HÄNSEL

Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin-Dahlem (Deutschland), 6. November 1961.

<sup>1</sup> J. BELIC, J. BERGANT-DOLAR und R. A. MORTON, J. chem. Soc. 1961, 2523.

<sup>2</sup> E. WINDE und R. HÄNSEL, Arch. Pharmaz. 293, 556 (1960). – E. WINDE, Dissertation Berlin 1959. – E. WINDE und R. HÄNSEL, Arzneimittelforsch. 9, 189 (1959).

<sup>3</sup> M. SIRAIT, Dissertation Berlin, Juni 1961. – H. RIMPLER, Dissertation in Vorbereitung.

<sup>4</sup> H. NAKAMURA, T. OHTA und G. HUKUTI, ref. Chem. Zbl. 1936, II, 3801.

order of magnitude of about a million per 1 ml<sup>1</sup>. However, according to our further observations, the *coli* antibody level of the serum of achlorhydrics was not considerably

<sup>1</sup> V. VARRÓ, F. SZARVAS, I. CSERHÁTI, and V. BALÁZS, Gastroenterologia 94, 315 (1960).