

gelegentlich erwähnt⁴⁻⁶, aber nicht ausführlich publiziert worden sind. Um die Möglichkeit zu prüfen, dass bisher unberücksichtigt gebliebene Faktoren die erwähnte antagonistische Wirkung begünstigten, wurden in den hier vorliegenden Versuchen Änderungen betreffend Methodik, verwendete Herzglykoside und Steroide sowie pH und Zusammensetzung des Inkubationsmilieus vorgenommen. Unter anderem wurde so die Calciumionenkonzentration, durch welche das Ausmass des Kationentransports beeinflusst wird⁷, variiert. Daneben gelangte der Einfluss von Methylengrün, welches den oxydativen Glukoseabbau der Erythrocyten erhöht⁸, zur Untersuchung. Auch wurden einige Phosphorsäureester von Steroiden in die Versuche einbezogen auf Grund der Überlegung, dass möglicherweise die Bildung solcher phosphorylierter Derivate für den Antagonismus zu Herzglykosiden wesentlich sein könnte.

Methodik. Menschenblut wurde nach der Entnahme aus der Cubitalvene mit einem Holzstab defibriniert. Das Blut wurde mit Glukose (2–4 mg/ml) und den zu untersuchenden Substanzen versetzt und bei 37°C während 3–5 h inkubiert. Die Analyse des Na- und K-Gehaltes erfolgte flammenphotometrisch. Für die Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen wurden die Erythrocyten entsprechend dem Vorgehen von SULSER¹ zweimal in isotonischer $MgCl_2$ -Lösung gewaschen und dann hämolysiert. Zusätzlich wurde in einigen Versuchen der K-Gehalt der Aussenlösung durch Analyse der überstehenden Flüssigkeit nach Abzentrifugieren der Zellen verfolgt. Die Zellkonzentration betrug in den meisten Versuchen 40–50%. Es wurden sowohl mit Frischblut wie auch mit während mehrerer Tage bei 2–4°C aufbewahrt Blut Versuche durchgeführt. Als zuverlässigstes Mass für die Angabe der Na- und K-Verschiebungen erwies sich, in Übereinstimmung mit SCHATZMANN⁹, das Verhältnis der beiden Kationenkonzentrationen, Na/K, im Intrazellulärraum.

Ergebnisse.

(a) Variation der Hemmstoffe und Steroide: Die verwendeten Kombinationen von Hemmstoff mit Nebennierenrindenhormon waren folgende: K-Strophanthosid (10^{-7} bis 10^{-6} g/ml) und 9- α -Fluorohydrocortison (10^{-4} g/ml); Ouabain ($5 \cdot 10^{-7}$ bis $5 \cdot 10^{-8}$ g/ml) mit Aldosteron (10^{-5} g/ml) und Cortison- (10^{-3} g/ml), Hydrocortison-, Prednisolon- und Dexamethason-Na-Phosphat (10^{-4} g/ml). Die Steroide Cortison und 9- α -Fluorohydrocortison wurden mit Hilfe von Alkohol in Lösung gebracht, Cortison-Na-Phosphat wurde in Substanz zugegeben. Die Konzentrationen der Glykoside wurden im allgemeinen so gewählt, dass zwar eine gut messbare, jedoch keine maximale Hemmwirkung zustande kam.

Mit keiner der erwähnten Substanzkombinationen liess sich in insgesamt 30 Versuchen ein Antagonismus zwischen Herzglykosid und Corticosteroid erkennen.

(b) Variation der Versuchsbedingungen: Um der Frage nachzugehen, ob neben Hemmstoff und Steroid möglicherweise noch ein zusätzlicher Faktor für das Manifestwerden eines Antagonismus erforderlich ist, wurden die Inkubationsbedingungen in mehrfacher Weise modifiziert. Folgende Zusätze zum Inkubationsmilieu wurden vorgenommen:

Isotonische $CaCl_2$ -Lösung (0,05 ml/ml Blut); Versen (Dinatrium-äthylendiamintetraacetat) (2 mg/ml Blut); isotonische $MgCl_2$ -Lösung (0,004–0,1 ml/ml Blut); 0,5n NaOH (bis 0,05 ml/ml Blut); 0,5n HCl (bis 0,5 ml/ml Blut); Methylengrün (1 mg/ml Blut). Auch wurde eine Blutprobe im Vakuum von CO_2 befreit und so für Versuche verwendet. Ferner wurde an Stelle von defibriniertem Blut Citratblut (0,45% Zitronensäure und 1,6% Na-Citrat) benutzt. Schliesslich konnte durch Trennung der Zellen vom Serum bei Frischblut, Kältelagerung der Zellen in einer physiologischen Salzlösung und späteres Wiederzusammenbringen der gewaschenen Na-reichen Zellen mit dem K-armen Frischblutserum, die Aussenkonzentration des K für gleiche Zellen in ihrem eigenen Milieu variiert werden. Mit diesen variierten Milieubedingungen wurden insgesamt 19 Versuche durchgeführt. Es zeigte sich jedoch in keinem Falle eine signifikante Verminderung des Glykosideffektes durch Steroide. In einigen speziellen Versuchen wurde geprüft, ob sich die Glycosidwirkung auswaschen lässt. Dies gelang nicht und konnte auch nicht durch Zusatz von Aldosteron (10^{-5} g/ml) zur Waschflüssigkeit erreicht werden.

Die Diskrepanz zwischen den Resultaten SULSERS und den unsrigen hat sich danach nicht klären lassen. Die früher mitgeteilten Befunde konnten mit keiner der genannten methodischen Varianten reproduziert werden.

Summary. Previous experiments indicating antagonistic effects of cardiac glycosides and corticosteroids on ion transport in red cells and published independently from our own laboratories¹ and by BERNSTEIN² could not be repeated under a variety of experimental conditions.

H. W. IFF, R. SCHINDLER und W. WILBRANDT

Pharmakologisches Institut der Universität Bern (Schweiz), 3. Mai 1962.

⁴ W. WILBRANDT, Fortsch. Zool. 12, 28 (1960).

⁵ W. WILBRANDT, *Bad Öynhausener Gespräche* (Springer-Verlag 91, 1959), Bd. 3.

⁶ W. WILBRANDT and W. T. ROSENBERG, Pharmacol. Rev. 13, 109 (1961).

⁷ J. B. KAHN, J. Pharmacol. exp. Therap. 123, 263 (1958).

⁸ E. S. G. BARRON und G. A. HARROP, J. biol. Chem. 79, 65 (1928).

⁹ H. J. SCHATZMANN, Helv. physiol. Acta 11, 346 (1953).

Observations on Division of Mitochondria in Dedifferentiating Cells of *Splachnum ampullaceum* (L.) Hedw.

In the course of an investigation of the behaviour of cellular organelles in dedifferentiating leaf cells by means of electron microscopy, it was shown that chloroplasts produce plastid initials by means of 'budding fission'¹. Similar behaviour has now been observed in mitochondria and this is described in the present communication. Plant

material and methods are the same as those described previously². Leaves were fixed in 2% $KMnO_4$ in veronal acetate buffer adjusted to a pH of 7.3. They were stained with uranylacetate and embedded in Araldit.

¹ K. VON MALTZAHN and K. MÜHLETHALER, Naturwiss., in preparation.

² M. M. MACNUTT and K. VON MALTZAHN, Can. J. Bot. 38, 895 (1960).

Figure 1 represents a cross section of part of a cell of a leaf, 26 h following isolation of the leaf from the gametophore. Two mitochondria are visible, each having a small electron dense almost spherical body attached to it at the periphery. These bodies are surrounded by a double membrane, the inner membrane being smooth and the outer one apparently still continuous with that of the mitochondrion to which the body is attached. These mitochondria seem to undergo a process of 'budding fission' similar to that described for chloroplasts in the present plant material¹. It is assumed that the chamber of the bud is initially continuous with that of the mitochondrion from which the bud arises. Following completion of fission, one of the products of this process is an independent small spherical structure surrounded by a double membrane, both membranes being smooth and enclosing the relatively electron dense chamber. This body represents a mitochondrial initial. Such an independent state has almost been attained by the bud of the mitochondrion on the right hand side of Figure 1. It should be

stated that mitochondrial initials and plastid initials are similar morphologically immediately following their formation. Plastid initials, however, appear to enlarge to a greater extent before their relative growth of length to width changes in favour of growth in length. Differential growth of the two membranes seems to be initiated much earlier in mitochondrial initials compared to plastid initials resulting in cristae formation while promitochondria are still small. This is represented in Figures 2 and 3.

Variation in size of mitochondria appears to be small in the mitochondrial population of mature leaf cells. In later stages of cellular dedifferentiation, one finds a mitochondrial population representing various developmental stages including some large mitochondria with elaborate shapes. The density of the mitochondrial population seems to have increased here also. It is suggested, therefore, that the population of promitochondria and smaller mitochondria is at least partly derived from the mitochondrial initials formed by means of 'budding fission' as described above. It should be noted that BAL and DEEPESH³ have found in the progressive development in microsporogenesis of *Tradescantia* that 'promitochondria' with poorly defined or no cristae may still divide by means of budding.

Figure 4 represents a diagrammatical representation of the present observations and their interpretation. In the process of cellular dedifferentiation, mitochondrial development appears, therefore, to be reversible by means of 'budding fission' of mature mitochondria resulting in the formation of mitochondrial initials. The behaviour of the mitochondria appears to be similar to that of the plastids during cellular dedifferentiation. The continuity of mitochondria seems to be maintained in the process of regeneration⁴.

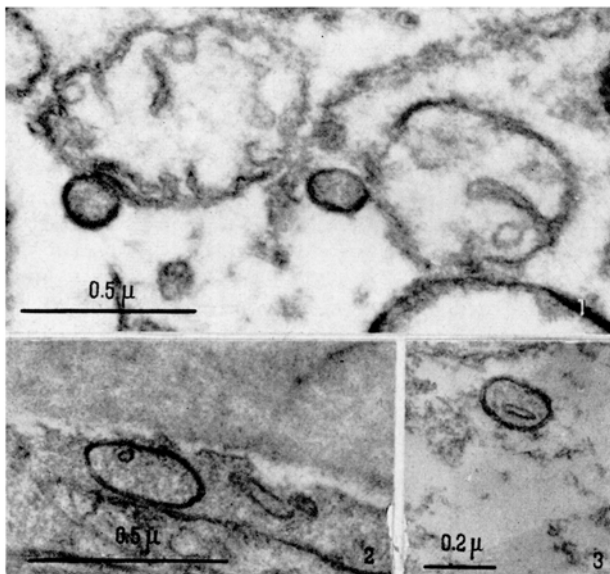


Fig. 1. Two mitochondria with 'buds'. Magnification 45000:1. Fig. 2. Promitochondrion. Magnification: 52000:1. Fig. 3. Promitochondrion. Magnification: 45000:1.

Zusammenfassung. Während der Dedifferenzierung von Blattzellen des Gametophoren von *Splachnum ampullaceum* (L.) Hedw. sind Teilungen von Mitochondrien durch Sprossung beobachtet worden. Mit Hilfe dieses Vorganges bilden sich Mitochondrieninitialen. Auf Grund dieser Beobachtungen wird die Reversibilität der Mitochondrienentwicklung und die Kontinuität von Mitochondrien während der Regeneration wahrscheinlich gemacht.

K. VON MALTZAHN and K. MÜHLETHALER

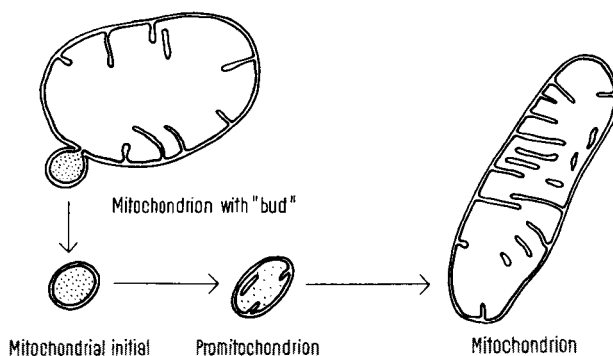


Fig. 4. Diagram describing the present observations.

Botanical Laboratories, Dalhousie University, Halifax (Canada), and Laboratorium für Elektronenmikroskopie, Institut für Allgemeine Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich (Switzerland), March 29, 1962.

³ ARYA K. BAL and N. DE. DEEPESH, Developmental Biol. 3, 241 (1961).

⁴ Acknowledgment. This study has been made possible through a senior award of the Royal Society of Canada and a travel grant of the National Research Council of Canada given to the senior author.