

Fig. 1. Immunoélectrophorèse comparée, développée entre l'immunsérum de lapin antitumeur de Walker (cuves longitudinales) et les extraits solubles du foie de rat porteur de la tumeur (A), de rat normal (B), d'embryon de rat (C), de rat nouveau-né (D), de rate gestante (E) et de rat partiellement hépatectomisé (F).

A noter que l'antigène tumoral apparaît uniquement dans le foie de rat porteur de la tumeur de Walker (voir flèche).

Nous avons aussi employé la méthode de précipitation par double diffusion en milieu gélifié¹⁰ dans les études préliminaires pour déceler la présence de cet antigène spécifique.

Résultats. Tous les extraits solubles hépatiques provenant du groupe 5, c'est à dire, des rats porteurs d'une tumeur de Walker depuis 15 jours, réagissent positivement, à la réaction de précipitation par double diffusion en milieu gélifié, avec l'immunsérum antitumeur purifié; par contre aucun précipité n'a été décelable avec les extraits hépatiques provenant d'autres groupes. La Figure 1 et 2 démontre indiscutablement que seul l'extrait hépatique soluble de rat porteur d'une tumeur de Walker possède une relation antigénique étroite avec l'immunsérum antitumeur purifié, aucune des conditions physiologiques et pathologiques illustrées dans l'expérience n'a laissé voir une seule trace de cette antigénicité. L'immunoélectrophorèse a, en outre, éclairci la nature albuminoïde de l'antigène tumoral décelé.

Discussion. Cette recherche montre donc indiscutablement la haute spécificité à la tumeur de Walker de cet antigène hépatique. Il n'est en effet présent que chez le rat

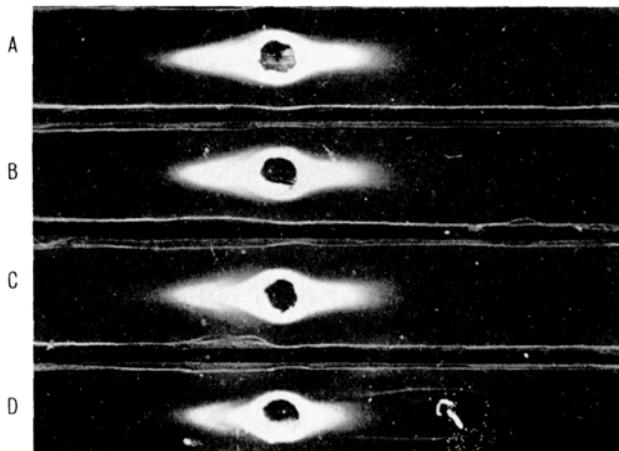


Fig. 2. Immunoélectrophorèse comparée, développée entre l'immunsérum de lapin antitumeur de Walker (cuves longitudinales) et les extraits protéiques solubles du foie de rat normal (A), de rat arthritique (B), de rat porteur d'une inflammation aiguë (C) et de rat porteur de la tumeur de Walker (D).

A noter que seul l'extrait hépatique soluble de rat porteur de la tumeur possède la réactivité antigénique spécifique (voir flèche).

porteur de la greffe tumorale. Ceci le dissocie donc du facteur protéique du sérum de Darcy⁶ et Heim⁷ et probablement aussi du facteur hépatique de Sayre et al.¹¹, facteur qui jouerait un rôle dans la croissance tissulaire et la différenciation.

Etant donné, cependant, l'hétérogénéité de la tumeur de Walker, il se pourrait que cet antigène en soit la signature et corresponde à une réaction d'incompatibilité. Aussi nous avons entrepris des recherches avec d'autres tumeurs isologues dans le but d'éliminer cette limitation¹².

Summary. By means of systematic comparative immuno-electrophoretic analysis, it has been shown that the antigenic material appearing in the liver of a Walker tumour bearing rat is highly specific to the tumour. In fact we have been unable to detect such an antigen either in embryonic neonatal, regenerating or in the liver of acute inflammations bearing rats.

D. DUFOUR et D. B. LINH

Département de Biochimie, Université Laval, Québec (Canada), le 19 mars 1962.

¹⁰ B. OUCHTERLONY, Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 756 (1951).

¹¹ F. W. SAYRE, E. HANSEN, T. J. STARR et E. A. YARWOOD, Nature 190, 1116 (1961).

¹² Remerciements. Nous remercions Madame COLETTE G.-PARÉ et Monsieur J. PROULX pour leur collaboration.

Cytologische Beobachtungen an Rindererythrocyten mit Hämoglobin-Antikörpern

In diesem Jahrhundert erschienen zahlreiche Arbeiten, die mehr oder weniger verschiedene Methoden zur Herstellung der Erythrocytenmembranen oder der Stroma-proteine empfohlen. In der Mehrzahl dieser Arbeiten wurde angeführt, dass die isolierten Membranpräparate wechselnde Mengen von Hämoglobin enthielten. Nur

wenigen Autoren gelang es, die Erythrocytenmembran praktisch hämoglobinfrei herzustellen.

Wir haben während ca. 20 aufeinanderfolgenden Wochen mit verschiedenen Methoden aus jeweils frischen Rindererythrocyten und während einiger Wochen aus Menschen- und Schaferythrocyten Membranen hergestellt¹. Alle

¹ J. TOMESIK und M. SCHERRER-GERVAL, Path. Microbiol. 24, 945 (1961).

unsere Membranpräparate enthielten Hämoglobin. Wir haben uns die Frage gestellt: Sind die Hämoglobinkomplexe in irgendeiner Membranschicht strukturell eingebaut, oder aber werden sie erst während der Herstellung der Membranen, durch diese, gebunden?

Die zweite Hälfte dieser Frage könnte mit dem folgenden Beispiel aus dem Gebiet der Mikrobiologie illustriert werden. Ein spezifisches Polysaccharid wurde in *B. anthracis*², später auch in den isolierten Zellwandpräparaten dieses Bazillus³ nachgewiesen. Andere Autoren beschrieben ein zweites Polysaccharid⁴, welches aber nur aus Milzbrandbazillen, die auf einem speziellen Nährboden gezüchtet wurden, isoliert werden konnte und nichtspezifische Präzipitinreaktionen ergab⁵. Das zweite Polysaccharid (Hefe-Mannan) wurde von den sich vermehrenden Milzbrandbazillen aus dem Hefeextrakt enthaltenden Nährboden aufgenommen und derartig stark gebunden, dass dieses trotz mehrmaligem Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung nicht entfernt werden konnte⁵. Lysozym-behandelte *B. megaterium*-Sporen binden das Lysozym derart stark, dass sie selbst nach fünfmaligem Waschen in Kaninchen auch Lysozymantikörper produzieren⁵.

In Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit konnten wir das Hämoglobin aus unseren Erythrocytenmembranpräparaten durch mehrmaliges Waschen nicht entfernen. pH-Änderungen setzten das Hämoglobin aus den Membranen nicht frei. Doch erhielten wir anlässlich der Immunisierung von zahlreichen Kaninchen mit Membranen äusserst selten eine ganz geringfügige Hämoglobin-Antikörperproduktion.

Zu den weiteren Immunisierungen wählten wir kristallisiertes Rinderhämoglobin (Armour, USA). Kaninchen wurden sowohl nach der Freundschen Adjuvans-Methode mit 2% Hämoglobinlösung subkutan als auch ohne Adjuvantien mit 0,1–2% Hämoglobinlösung (in physiologischem NaCl) intravenös behandelt. Mit der Freudschen Depotmethode wurden Antikörper nach 3 bis 7 Injektionen, mit der einfachen intravenösen Methode nach 7 bis 10 Injektionen in genügender Menge produziert.

Die Immunsera gaben eine Hämagglytination mit trypsinisierten Rindererythrocyten in einer Verdünnung bis 1:400 bzw. bis 1:6400. Das Hämoglobin wurde durch diese Immunsera höchstens in einer Verdünnung von 1:64 000 spezifisch präzipitiert.

Der beträchtliche Hämagglytinationstiter durch unsere «Hämoglobinantisera» war für uns überraschend und gleichzeitig bedenklich. Deshalb wurde eine grössere Menge der Hämoglobinlösung in einer Kühlzentrifuge bei

6000 U lange Zeit zentrifugiert. Es entstand ein geringes Sediment, in dem phasenoptisch Erythrocytenmembranen festgestellt werden konnten. Die letzteren wurden durch Seitzfilter entfernt. Dieses klare Hämoglobinfiltrat wurde wiederum zur Vorbehandlung von Kaninchen verwendet. Diesmal wurden nur präzipitierende Antikörper gegen das Hämoglobin und keine agglutinierenden Antikörper gegenüber trypsinisierten Rindererythrocyten gebildet.

Diskussion. Wenn das Hämoglobin einen Bestandteil der Erythrocytenmembran – mindestens in die tiefere semipermeable Schicht eingebaut – bilden würde, sollte mit entsprechend präparierten Erythrocyten eine Hämagglytination entstehen. Am einfachsten können die tiefer liegenden Schichten der Erythrocytenmembran mit einer vorsichtig durchgeföhrten Trypsin- oder Papainverdauung freigelegt werden. Da die derartig vorbehandelten Erythrocyten mit Hämoglobinantikörpern allein nicht agglutiniert werden können, kann das Hämoglobin nicht in die Membran der intakten Erythrocyten strukturell eingebaut sein. Der Hämoglobininhalt der isolierten Erythrocytenmembranen ist wahrscheinlich auf eine Absorption zurückzuführen, die bei der hypotonischen Hämolyse entsteht. Ein Hämoglobinpräparat, welches mit kleinen Mengen von Membranen verunreinigt ist, produziert in Kaninchen zwei Antikörper. Der eine, der Hämoglobinantikörper, gibt nur mit Hämoglobin eine Präzipitinreaktion, der andere, der Membranantikörper, spielt allein eine Rolle in der Hämagglytination.

Summary. A commercial crystallised beef-haemoglobin preparation, freed from membranes, produced in rabbits an immune-serum which gave a specific precipitation reaction with haemoglobin and did not agglutinate the trypsin-treated erythrocytes. The haemoglobin is not a structural element of the erythrocyte membrane but it is absorbed to these secondarily during their preparation.

J. TOMCSIK und MARIANN SCHERRER-GERVAI

Hygiene-Institut der Universität Basel (Schweiz), 25. Mai 1962.

² J. TOMCSIK und H. SZONGOTT, Z. Immunforsch. 76, 214 (1932).

³ J. B. BAUMANN-GRACE, H. KOVACS und J. TOMCSIK, Schweiz. Z. Path. Bakt. 22, 158 (1959).

⁴ J. E. CAVE-BROWN-CAVE, E. S. J. FRY, H. S. EL CADEM und H. N. RYDON, J. chem. Soc. 1954, 3866.

⁵ J. B. BAUMANN-GRACE und J. TOMCSIK, Exper. 15, 805 (1959).

Die Wirkung von Spirolactonen und von Herzglykosiden auf den Natrium- und Kaliumtransport an Erythrocyten¹

Es wird heute allgemein angenommen, dass der hohe Zellkalium- und der niedrige Zellnatriumgehalt durch einen Pumpmechanismus aufrechterhalten wird, der ständig gegen den Konzentrationsgradienten Kalium in die Zellen hinein und Natrium aus den Zellen hinaus pumpt. Dieser aktive Transport kann durch Herzglykoside gehemmt werden^{2–4}. POST et al. und DUNHAM und GLYNN zeigten an Versuchen mit Erythrocytenschatten, dass diese Hemmung mit einer Verminderung eines bestimmten Anteils der ATP-ase-Aktivität in den Erythrocytenmembranen zusammenhängen könnte^{5,6}.

KAGAWA prüfte die Wirkung verschiedener von CELLA⁷ synthetisierte Substanzen, den Spirolactonen, die sowohl den Corticosteroiden (im Grundgerüst), wie den Herzglykosiden (im Lactonring), strukturell ähnlich sind. Sie

¹ Diese Arbeit wurde unterstützt durch ein Stipendium der CIBA für naturwissenschaftliche, medizinische und technische Forschung.

² J. H. SCHATZMANN, Helv. physiol. Acta 11, 346 (1953).

³ V. KOEFOED-JOHNSON, Acta physiol. scand. 42, Suppl. 97 (1952).

⁴ M. MAIZELS und M. REMINGTON, J. Physiol. 149, 61 (1958).

⁵ R. L. POST, C. R. MERRIT, C. R. KINSOLVING und C. D. ALBRIGHT, J. biol. Chem. 233, 1796 (1960).

⁶ E. T. DUNHAM und I. M. GLYNN, J. Physiol. 156, 274 (1961).

⁷ J. A. CELLA, E. A. BROWN und R. R. BURTNER, J. org. Chem. 24, 743 (1959).