

bindenden Wirksamkeit ausgelesen worden. Die Tatsache, dass sich alle diese Substanzen als mehr oder weniger aktiv erwiesen, bildet eine Stütze für die eingangs erwähnte Hypothese, wonach eine Bindung des Calciums für die Resorptionsbegünstigung von Heparin massgebend ist.

Die Beobachtung, dass erhebliche quantitative Unterschiede zwischen den geprüften Stoffklassen bestehen, spricht dafür, dass noch andere Faktoren beim Zustandekommen der resorptionsfördernden Wirkung beteiligt sind. Auffallend ist vor allem die Wirkungsabnahme, welche bei einer Dosissteigerung über ein gewisses Optimum hinaus bei den Ionenaustauschern beobachtet wird. Bei der Vielfalt der Vorgänge, die sich an einem Ionenaustauscher abspielen können, kommen mehrere Erklärungsmöglichkeiten für diese Erscheinung in Frage.

**Summary.** The gastroenteral absorption of heparin in rats as measured by clearing-factor activation is considerably enhanced by simultaneous administration of a number of calcium-binding substances as ethylenediamine-tetraacetate, sodium citrate, ion-exchangers, soaps and phosphates.

Single oral administrations of heparin at the very high dose of 2 g/kg also lead to a maximum activity of the clearing factor.

A binding of calcium ions seems to enable the intestinal absorption of heparin in all these cases.

K. REBER und A. STUDER

*Abteilung für experimentelle Medizin der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel (Schweiz), 2. Januar 1963.*

## Über die Beeinflussung des Serumkomplementes durch Vitamin-K-Mangel beim Küken

In Fortführung früherer Untersuchungen über die Beeinflussung des an der unspezifischen Infektabwehr beteiligten Properdin- und Komplementsystems durch Pantothenäure- und Vitamin A-Mangel bei Ratten<sup>1,2</sup> prüften wir auch die Wirkung von Vitamin-K-Mangel auf das Serumkomplement beim Küken. In der vorliegenden Arbeit wurden das Gesamtkomplement (C') und seine vier Komponenten (C'1 bis C'4) bestimmt<sup>3</sup>. Auf eine Bestimmung des Properdins musste verzichtet werden, weil diese aus methodischen Gründen im Küken Serum nicht möglich ist. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Befunden aus anderen Instituten<sup>3</sup>. Sie ist darauf zurückzuführen, dass ein Inhibitor ( $\alpha_2$ -Globulin) im Küken Serum vorliegt, der die direkte Bestimmung des Properdintiters nach den üblichen Methoden verhindert. Das Serumkomplementsystem steht in enger Beziehung zum Properdin, dessen Wirksamkeit gegenüber Bakterien von der Anwesenheit ausreichender Mengen der vier Komponenten des Komplements abhängt. Es verhält sich in mancher Beziehung gleich wie die frühzeitig nach Immunisierung auftretenden hitzelablen 19S $\beta_2$ -Globuline. Im weitesten Sinn kann Properdin als Antikörper aufgefasst werden, der gegen eine vielen bakteriellen Polysacchariden gemeinsame Konfiguration gerichtet ist. Wahrscheinlich markiert es das infektiöse Agens in der Weise, dass das Komplementsystem über die Bildung von Lysolecithin die Cytolyse der Infektionskeime durch-

führen kann<sup>4</sup>. Neueste experimentelle Resultate unterstützen diese Hypothese<sup>5</sup>.

Unsere Versuchsergebnisse (Tabelle I) zeigen, dass Vitamin-K-Mangel beim Küken eine signifikante Erniedrigung des Gesamtkomplementes zur Folge hat ( $P < 0,01$ ). Wie aus den Titerwerten für die vier Komponenten des Komplementes hervorgeht, ist die Abnahme des Gesamtkomplementes in der Hauptsache auf eine Erniedrigung der Komponente C'1 zurückzuführen ( $P < 0,01$ ). Die übrigen Komponenten sind praktisch unbeeinflusst. Perorale Verabreichung von je 50  $\mu$ g Vitamin K<sub>1</sub> an drei aufeinanderfolgenden Tagen an die Mangeltiere hatte innerhalb dieses Zeitraumes keinen signifikanten Einfluss auf die Nachsynthese von C'1, während die verlängerte Blutgerinnungszeit der Vitamin-K-Mangelküken wieder vollständig normalisiert wurde (Tabelle II).

Daraus geht hervor, dass die Nachsynthese der Komplementkomponente C'1 beträchtlich langsamer erfolgt, als dies für die Synthese von Blutgerinnungsfaktoren der

<sup>1</sup> O. WISS, F. WEBER und H. ISLIKER, Schweiz. med. Wschr. 87, 1430 (1957).

<sup>2</sup> H. ISLIKER, F. WEBER und O. WISS, Hoppe-Seylers Z. 320, 126 (1960).

<sup>3</sup> E. A. KABAT in *Experimental Immunochemistry* (Ch. C. Thomas, Springfield, Ill. 1961).

<sup>4</sup> H. ISLIKER, Schweiz. med. Wschr. 88, 127 (1958).

<sup>5</sup> H. FISCHER und I. HAUPT, Z. Naturforsch. 16b, 321 (1961).

<sup>6</sup> O. WISS, F. WEBER, R. RÜEGG und O. ISLER, Hoppe-Seylers Z. 314, 245 (1959).

Tabelle I. Komplement-Titer des Serums von normalen und Vitamin-K-Mangelküken

Tiergruppe	Anzahl Küken	Titer* von Gesamtkomplement C'	Komplementkomponenten			
			C'1	C'2	C'3	C'4
Kontrollküken	11	9,24 $\pm$ 1,81	7,57 $\pm$ 2,34	4,23 $\pm$ 0,74	4,94 $\pm$ 2,03 <sup>b</sup>	5,69 $\pm$ 2,18 <sup>b</sup>
Vitamin-K-Mangelküken*	9	5,57 $\pm$ 1,48	3,77 $\pm$ 1,44	3,61 $\pm$ 1,19	4,72 $\pm$ 2,76 <sup>d</sup>	6,75 $\pm$ 3,11 <sup>d</sup>
Gleiche Mangeltiere nach Vitamin K <sub>1</sub> -Verabreichung*	8	6,89 $\pm$ 1,91	3,80 $\pm$ 1,40	2,43 $\pm$ 0,54	3,68 $\pm$ 1,05 <sup>d</sup>	5,02 $\pm$ 1,38 <sup>d</sup>

\* Mittelwert  $\pm$  mittlerer Fehler (2 $\sigma$ -Grenze). <sup>b</sup> Wegen ungenügender Serummen gen konnte nur von 8 Seren der Titer bestimmt werden.

<sup>c</sup> Drei Wochen alte Küken (weisse Leghorn-Rasse), die 5 Wochen lang mit einem Vitamin-K-freien Futter<sup>6</sup> ernährt wurden. Die Kontrolltiere erhielten Normalfutter<sup>6</sup>. <sup>d</sup> Wegen ungenügender Serummen gen konnte nur von 6 Seren der Titer bestimmt werden. \* Den Küken wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 50  $\mu$ g Vitamin K<sub>1</sub> in 0,2 ml Arachisöl mit der Schlundsonde verabreicht.

Fall ist, die eine ganz besonders kurze Halbwertszeit besitzen<sup>8</sup>. Eine relativ langsam verlaufende Komplementproduktion ergab sich auch aus früheren Untersuchungen von BÜSING und ZUZAK<sup>9</sup> über den Zusammenhang zwischen Vitamin-K-Versorgung und Gesamtkomplement des Serums beim Küken. Die Autoren konnten zeigen, dass der bei Vitamin-K-Mangel erniedrigte Gehalt des Gesamtkomplementes erst eine Woche nach Verabreichung von 2-Methyl-1,4-disuccinyl-naphtho-hydrochinon (2,5 µg täglich) normalisiert wurde.

Tabelle II. Messung der Blutgerinnung (Prothrombinzeit) bei den gleichen Küken, die zur Bestimmung des Serumkomplementes verwendet wurden

Tiergruppe	Anzahl Küken	Prothrombinzeit* in sec <sup>b</sup>
Kontrollküken	11	35,4 ± 2,5
Vitamin K-Mangelküken	9	>180
Gleiche Mangeltiere nach Vitamin K <sub>1</sub> -Verabreichung <sup>c</sup>	8	33,0 ± 1,8

\* Die Bestimmung der Prothrombinzeit erfolgte nach der Methode von DAM et al.<sup>7</sup>.

<sup>b</sup> Mittelwert ± mittlerer Fehler (2σ-Grenze).

<sup>c</sup> An drei aufeinanderfolgenden Tagen je 50 µg Vitamin K<sub>1</sub> in 0,2 ml Arachisöl mit der Schlundsonde verabreicht.

Berichte<sup>10</sup>, denen zufolge eine direkte Beziehung zwischen der Komponente C'1 und dem Prothrombin besteht, können auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht gestützt werden.

**Summary.** In vitamin K deficient chicken the serum complement (C') level is significantly decreased, as compared with normal animals, due to a lower level of its component C'1. Administration of vitamin K<sub>1</sub> for three days did not restore its titer although the prolonged blood clotting time became normal. The results thus indicate a considerably slower resynthesis of the complement factor C'1 than of prothrombin.

F. WEBER, O. WISS und H. ISLIKER

*Abteilung für Vitamin- und Ernährungsforschung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel, und Institut de Biochimie de l'Université de Lausanne (Schweiz), 17. Dezember 1962.*

<sup>7</sup> H. DAM, I. KRUSE und E. SØNDERGAARD, *Acta physiol. scand.* **22**, 238 (1951).

<sup>8</sup> C. MARTIUS, *Dtsch. med. Wschr.* **83**, 1701 (1958).

<sup>9</sup> K. H. BÜSING und H. ZUZAK, *Z. Immun.-Forsch.* **102**, 401 (1943).

<sup>10</sup> M. VON FALKENHAUSEN, *Biochem. Z.* **218**, 453 (1930).

## Free Amino-Acids in the Snail *Limnaea* and their Changes with Morphogenesis

HADORN and MITCHELL<sup>1</sup> first described a method of crushing organic material like *Drosophila* eggs, larvae, pupae etc. directly on the filter paper for separating the fluorescent and ninhydrin positive substances by means of paper chromatography. This technique was later used by BUZZATI-TRAVERSO<sup>2</sup>, and BUZZATI-TRAVERSO and RECHNITZER<sup>3</sup>. KIRK et al.<sup>4</sup> studied the chromatographic UV-absorption and fluorescence pattern of foot muscles from 7 species of land snails. The pattern is independent of the animal's size or age but is species specific. This, according to the authors, may be an aid towards understanding the biochemical basis of individuality. On the basis of their study on fish-tissues, BUZZATI-TRAVERSO and RECHNITZER<sup>3</sup> had also come to a similar conclusion.

Amino-acids, being the building blocks of proteins, are an interesting study. ROBERTS and SIMONSEN<sup>5</sup> have indeed compared the free amino-acid patterns of many marine organisms with those of certain malignant cells. KAVANAU<sup>6</sup> and CHEN<sup>7</sup> have studied in detail the amino-acid pattern of sea urchin and urodeles during embryonic stages. In a similar way we have studied the free amino-acid pattern of the snail *Limnaea* sp. at different stages of morphogenesis from egg to adult stage with the help of paper chromatography and electrophoresis. The solvent used for chromatography was *n*-Butanol-acetic acid-water :: 4:1:1. Three other solvent systems, namely (1) 70% ethanol, (2) *n*-Butanol-acetic acid-water :: 4:1:6, (3) *n*-Butanol-Pyridine-water :: 1:1:1, were also tried and found to be unsatisfactory. The following attempts were made. (1) Direct crushing of egg masses, young snails with shells and of shelled adult snails on Whatman paper No. 1

never gave any resolution but the intensity of ninhydrin staining with progressive age was very striking. (2) Whatman paper No. 4 gave clearer results with young snails crushed directly on it. (3) The supernatant, after centrifuging the product obtained from grinding the adult snail with sand in a glass mortar and then treating the mass with 70% ethanol, was further concentrated. This gave a comparatively faint but *excellent resolution* on Whatman No. 1. This method cannot be used with younger snails and egg masses with their low intrinsic contents of amino-acids. (4) The electropherograms with M/50 Borax buffer of adult snails crushed directly on Whatman No. 4 were fairly good (1½ h 250–300 V, 2–3 mA) but the intensity of ninhydrin-stain was low. They could not be used with young snails or egg masses.

The results based on (2) and (3) may be summed up thus: The egg mass at the stage of '2 days before hatching' has a significantly greater amino acid content than 6 days before hatching. 11 days before hatching, the amino acid content is very faint, in fact hardly distinguishable. Newly hatched snails (2–9 days) show three recognizable ninhydrin spots. One of these, starting from the origin itself,

<sup>1</sup> E. HADORN and H. K. MITCHELL, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **37**, 650 (1951).

<sup>2</sup> A. A. BUZZATI-TRAVERSO, in *New Approaches in Cell Biology* (Academic Press, 1960), p. 95.

<sup>3</sup> A. A. BUZZATI-TRAVERSO and A. B. RECHNITZER, *Science* **117**, 58 (1953).

<sup>4</sup> R. L. KIRK et al., *Biochem. J.* **57**, 440 (1954).

<sup>5</sup> E. ROBERTS and S. SIMONSEN, in *Amino Acids, Proteins and Cancer Biochemistry* (Academic Press, 1960), p. 142.

<sup>6</sup> J. L. KAVANAU, *Exp. Cell. Res.* **7**, 530 (1954).

<sup>7</sup> P. S. CHEN, *Exp. Cell. Res.* **10**, 675 (1956).