

as the glucoside of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid from the following evidence. The spot B gave positive reaction with Folin-Ciocalteu reagent but not with Arnow reagent and ammoniacal silver nitrate. These reactions indicate that the substance in question is not a free *o*-dihydroxyphenol.

Ultra-violet absorption spectrum of the eluate from spot B was very similar to that of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (Figure 2).

Accordingly, the eluate from spot B was hydrolysed with N-hydrochloric acid at 100°C for 3 h and the hydrolysate was subjected to paper chromatography. As shown in Figure 1 (4), two reducing spots were detected. These

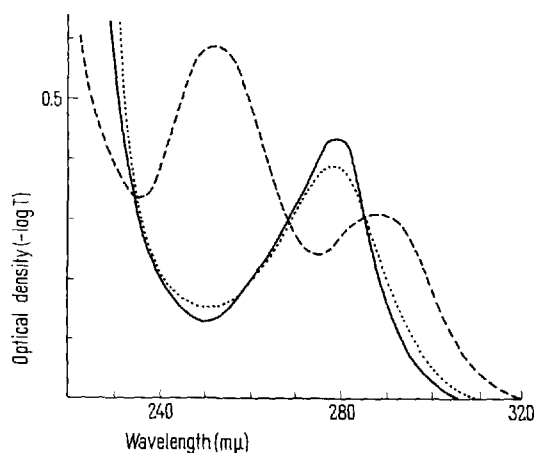


Fig. 2. Ultra violet absorption spectra of phenol derivatives.—All samples were eluted from chromatograms with distilled water and measured with Hitachi Spectrometer Model EPU-2a. Solid line; authentic 3,4-dihydroxyphenylacetic acid. Dotted line; the eluate from spot B. Broken line; authentic protocatechuic acid.

Rf values corresponded to those of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and glucose respectively.

The same result was obtained when the eluate from spot B was incubated at 37°C for 30 min with β -glucosidase prepared from apricot (Figure 1 (5)).

These results provided very strong evidence that the substance B was a β -glucoside of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid.

In order to know the position of glycosidic linkage, substance B was mixed with 2,6-dichloroquinone-4-chlorimide in an alkaline solution, following the method of GIBBS⁴. Indophenol blue was formed instantaneously, indicating that the position *para* to the phenolic hydroxyl group is unsubstituted, that is, glucose must be bound to 3,4-dihydroxyphenylacetic acid by 4-hydroxyl group.

Therefore, substance B was assumed to be 3-hydroxy-4-O-(β -glucopyranosido)-phenylacetic acid.

This substance was found abundantly in the oviduct of the mature female locust and white ootheca just after laying but hardly detected in immature female locust and coloured ootheca.

Résumé. J'ai démontré dans l'abdomen de la locuste femelle maturée, *Locusta migratoria*, l'existence d'une nouvelle substance diphenolique conjonctive. A l'aide de techniques chromatographiques sur papier, j'ai constaté que sa substance est identique à la 4-O- β -glucoside d'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique.

S. TOMINO

Department of Biology, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University, Tokyo (Japan), December 17, 1962.

⁴ H. D. GIBBS, J. biol. Chem. 72, 649 (1927).

Submikroskopische Struktur von Vanadocyten. Ein Beitrag zur Vanadin-Anhäufung bei Tunicaten

HENZE¹ fand im Blut der Ascidie *Phallusia mamillata* Cuvier grünliche, maulbeerförmige Zellen, die sich durch zwei Besonderheiten auszeichnen: Schwarzfärbung mit Osmiumsäure und Farbumschlag des Indikators Methylrot von Gelb (pH > 6.3) nach Rot (pH < 3.2). Die Schwärzung beruht auf der Reduktion des OsO₄ durch das in den Zellen angereicherte 3wertige Vanadin; mit ihm zu einer hellgrünen Koordinationsverbindung verknüpfte Schwefelsäure² ist für die Indikatorreaktion verantwortlich. Dieser Blutzelltyp wurde von WEBB³ Vanadocyten genannt und gegen die übrigen im Blut vorkommenden Zellarten⁴⁻⁶ histomorphologisch abgegrenzt: «In freshly drawn blood it has a circular outline, though after standing some time, or in fixed material, it takes a morula form so that the outline becomes rosette-shaped. It is about 8 μ in diameter and contains a number (usually 8-10) of inclusions which almost entirely fill the cell, leaving only a small space in or near the centre for the nucleus, which is slung by bridles from a thin peripheral layer of cytoplasm».

Das elektronenmikroskopische Bild OsO₄-fixierter, geschnittener Vanadocyten von *Phallusia mamillata* (Figur

1) lässt sich gut mit dem lichtmikroskopischen vergleichen. Die Bezirke der Vanadinanhäufung, die wir *Vanadophoren* nennen, zeigen eine besonders hohe elektronenoptische Dichte. Sie nehmen im Schnitt eine Fläche von je 2-6 μ^2 ein und entsprechen den lichtmikroskopisch erkennbaren, hellgrünen Einschlüssen. Neben sehr dichten Vanadophoren kommen stets auch solche grösserer Durchlässigkeit für Elektronen vor. In diesen wird eine feinkörnige Innenstruktur erkennbar (Figur 2). Der unterschiedliche Grad der Dichte kann von der Schrumpfung der sehr empfindlichen Zellen oder auch vom Ausmass der Metallanhäufung herrühren. Dass die Absorption der Elektronen tatsächlich durch Vanadin und nicht durch Osmium bedingt ist, geht aus Vergleichspräparaten hervor, die nur mit Formalin fixiert wurden. Durch das Schneiden bedingte Stauchungs- und Vibrationseffekte weisen auf eine höhere Konsistenz der Vanadophoren, verglichen mit den übrigen Zellbestandteilen, hin. Die

¹ M. HENZE, Hoppe-Seyler's Z. 86, 340 (1913).

² H.-J. BIELIG, E. BAYER, L. CALIFANO und L. WIRTH, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 25, 26 (1953).

³ D. A. WEBB, J. exp. Biol. 16, 499 (1939).

⁴ W. C. GEORGE, Quart. J. microscop. Sci. 81, 391 (1938/40).

⁵ M. AZÉMA, Ann. Inst. océanographique 17, 1 (1937/38).

⁶ R. ENDEAN, Quart. J. microscop. Sci. 101, 177 (1960).

Vanadocyten sind durch ein System agranulärer Cytomembranen gekammert, die die Vanadophoren allseitig umgeben und gegen den meist zentral gelegenen Zellkern abgrenzen. Bisweilen findet sich neben Kern und Vanado-

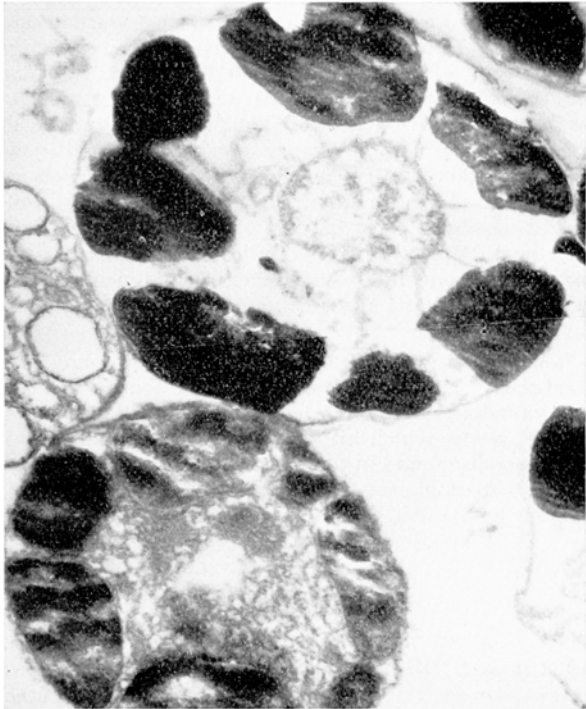


Fig. 1. Zellen aus punktiertem Blut von *Phallusia mamillata* Cuvier: Zwei Vanadocyten mit unterschiedlich dichten Vanadophoren. – Elektronenmikroskopisch: 5000fach; Figur: 15000fach (Präparat: 2710-11/62).

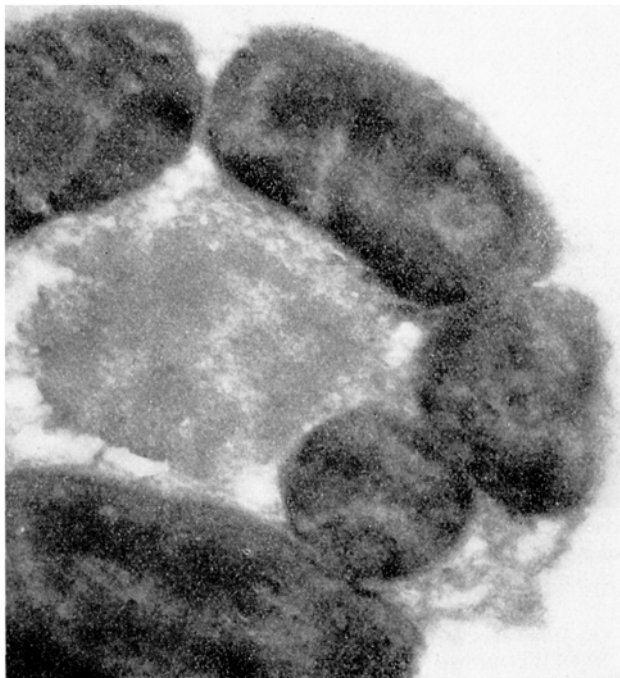


Fig. 2. Teil eines Vanadocyten geringer Dichte von *Phallusia*: Vanadophoren mit körniger Struktur. – Elektronenmikroskopisch: 20000fach; Figur: 40000fach (Präparat: 3769/62).

phoren noch eine grosse Vakuole. Andersartige Blutzellen mit zahlreichen, optisch leer erscheinenden Vakuolen (Figur 1, linker Bildrand) färben sich, wie wir im Nativpräparat festgestellt haben, weder mit OsO_4 schwarz, noch mit Methylrot rot.

Eine weitere Tunicate, *Ciona intestinalis* L., enthält ebenfalls Vanadin^{3,7}, allerdings in wesentlich geringerer Menge als *Phallusia mamillata*. Vanadocyten sollen hier nach lichtmikroskopischen und histochemischen Untersuchungen nicht vorkommen³. Da wir aber in Blutzellen dieser Art emissionsspektrographisch Vanadin festgestellt haben⁸, erhob sich die Frage, ob das Vanadin nicht indirekt durch die Anwesenheit von Vanadophoren nachgewiesen werden kann, nachdem es wegen seiner geringen Konzentration (ca. 1/15 des Gehaltes der Blutzellen von *Phallusia*) oder wegen des Vorliegens in einer höheren Wertigkeitsstufe im OsO_4 -Test nicht erkennbar wird.

Im elektronenmikroskopischen Bild von *Ciona*-Blutzellen (Figur 3) werden tatsächlich *Vanadophoren* sichtbar. Sie können eine ähnlich hohe Dichte aufweisen wie jene in den Vanadocyten von *Phallusia*, füllen aber die Zelle in weit geringerem Masse aus, so dass sie hier annähernd rund erscheinen. Neben Zellen, die im Schnitt nur *einen* Vanadophoren aufweisen, gibt es andere mit mehreren Vanadophoren von recht unterschiedlicher Grösse (0.4–2.8 μ Durchmesser). In weniger dichten

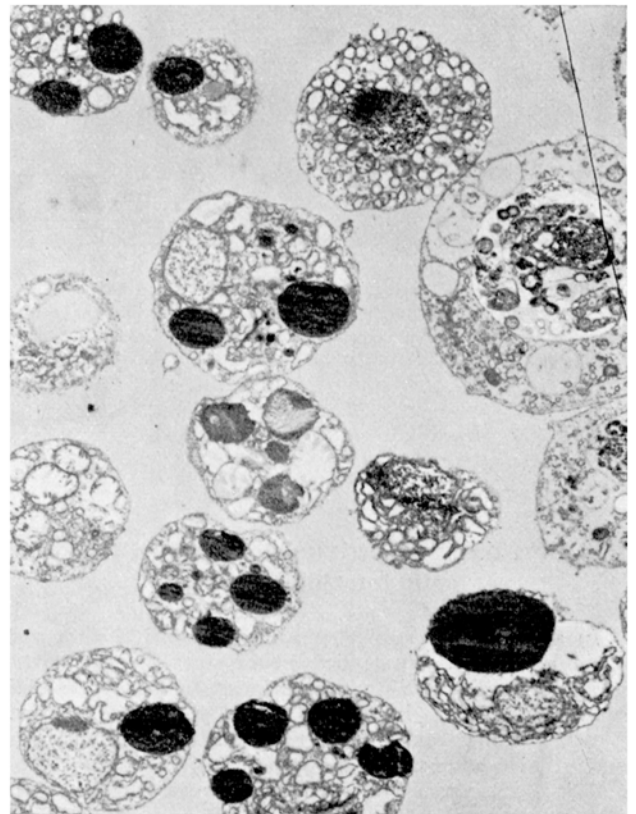


Fig. 3. Blutzellen aus dem Branchialnetz von *Ciona intestinalis* L.: Vanadocyten mit Vanadophoren unterschiedlicher Grösse, Dichte und Zahl. – Elektronenmikroskopisch: 2500fach; Figur: 5000fach (Präparat: 4970/61).

⁷ E. D. GOLDBERG, W. McBLAIR und K. M. TAYLOR, Biol. Bull. 101, 84 (1951).

⁸ H.-J. BIELIG, K. PFLEGER, W. RUMMEL und E. SEIFEN, Hoppe-Seyler's Z. 326, 249 (1961).

Vanadophoren (vgl. Figur 3, Mitte) erkennt man zentral gelegene, meist in einer Richtung angeordnete Fasern (Figur 4). Es erscheint uns berechtigt, die Vanadophoren enthaltenden Zellen von *Ciona intestinalis*, unabhängig von ihrer etwas anderen Struktur, ebenfalls als Vanadocyten anzusehen. Neben dem meist exzentrisch gelegenen

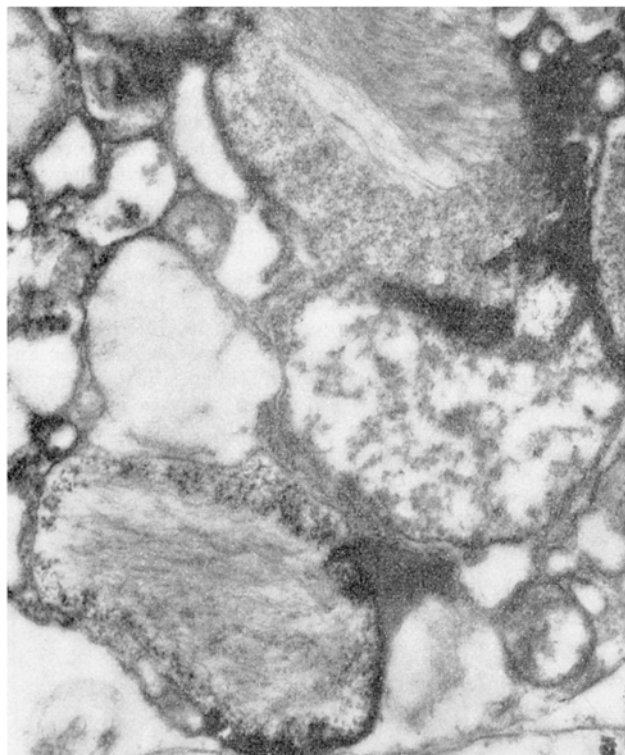


Fig. 4. Teil eines Vanadocyten geringer Dichte von *Ciona*: Feinkörnige Struktur am Rande und feinste Filamente (100 Å Durchmesser) im zentralen Bereich von Vanadophoren. – Elektronenmikroskopisch: 15000fach; Figur: 30000fach (Präparat: 4971/61).

Zellkern fallen in ihrem Cytoplasma zahlreiche Vakuolen variierenden Volumens auf. PÉRÈS⁹ beobachtete lichtmikroskopisch ähnliche Zelltypen.

Herstellung der Präparate¹⁰. Das Herz lebender Exemplare von *Phallusia mamillata* Cuvier wurde durch die geöffnete Tunica mit einer Spritze punktiert. Die sedimentierten, schwach grüngelben Blutzellen wurden dann in einer mit Saccharose bereiteten, gepufferten 1%igen OsO_4 -Lösung nach CAULFIELD¹¹ bei 4° fixiert. Bei *Ciona intestinalis* L. wurde der Branchialsack entnommen und das abpräparierte Netz unter gleichen Bedingungen der Fixierung unterworfen. Entwässert wurde über die aufsteigende Alkoholreihe, eingebettet in ein Gemisch von Butyl- und Methylmethacrylat (7:1 Vol.). Die Polymerisationstemperatur betrug 60°. Geschnitten wurde mit einem Porter-Blum-Ultramikrotom (Firma Servall). Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen stand ein Siemens-Elmiskop I zur Verfügung.

Summary. Electronmicroscopical sections prepared from blood cells of *Phallusia mamillata* Cuvier containing vanadine (vanadocytes) exhibit dense areas with cytoplasmic compartments, which are called vanadophores. Vanadophores are also found in the blood cells of *Ciona intestinalis* L. The vanadophores show an inner structure which is granular or filamentous in character.

H. GANSLER, K. PFLEGER,
E. SEIFEN, und H.-J. BIELIG

Elektronenmikroskopische Abteilung der Medizinischen Fakultät und Pharmakologisches Institut der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar), sowie Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg (Deutschland), 21. Januar 1963.

⁹ J.-M. PÉRÈS, Ann. Inst. océanographique 21, 229 (1941/43).

¹⁰ Herrn Dr. K. ALLMANN haben wir für seine Mithilfe bei der Gewinnung und Präparation des Materials zu danken.

¹¹ J. B. CAULFIELD, J. biophys. biochem. Cytol. 3, 827 (1957).

Ulteriori dati sull'attività dei derivati triazinici nelle infezioni da virus

In precedenti lavori¹⁻⁴ sono stati descritti numerosi derivati triazinici simmetrici di cui è stata saggiata l'attività antivirale nelle uova embrionate e nei topi albini inoculati con virus influenzali tipo B ceppo Lee e Craw. L'attività antivirale di questi composti è stata saggiata anche nei confronti del ceppo Lansing del virus poliomelittico, del ceppo Bruxelles del virus erpetico inoculati per via intracerebrale nei topi albini e in prove di virucidia *in vitro* nei confronti dei sopradetti virus.

Delle numerose sostanze sintetizzate, soltanto alcune si sono dimostrate attive nei confronti della infezione da virus influenzali negli animali da esperimento; in particolare modo interessante, per tossicità e attività, si è rivelata la 2-morfolinil-4-amino-s-triazina (1, Tabella I). In base a questi risultati abbiamo analizzato i rapporti esistenti tra attività e struttura chimica di una serie di composti triazinici simmetrici, aventi in comune l'anello morfolinico (Tabella).

L'attività dei composti nei confronti della infezione con virus influenzali è stata valutata con la metodica già descritta¹⁻⁴ che tiene conto delle differenze nel numero dei sopravvissuti fra i gruppi degli animali trattati ed i gruppi degli animali di controllo e delle differenze, tra i detti gruppi, della intensità delle lesioni polmonari. Le sostanze sono state iniettate sottocute sospese in carbosimetilcellulosa all'1% 2 volte al giorno per una settimana, alla dose di 140 mg/kg.

I risultati ottenuti con le sostanze da noi studiate, ci consentono di rilevare che la miglior attività protettiva si riscontra nei composti in cui il gruppo $-\text{NH}_2$ è libero o monosostituito e la posizione 6 libera.

¹ R. ANGELUCCI, D. ARTINI, P. N. GIRALDI, W. LOGEMANN e G. NANNINI, Il Farmaco, ed. sci. 16, 663 (1961).

² R. ANGELUCCI, D. ARTINI, P. N. GIRALDI, W. LOGEMANN, G. NANNINI e G. VALZELLI, Chemotherapy, in corso di stampa.

³ R. ANGELUCCI, G. Malattie infett. parassit. 13, 309 (1961).

⁴ R. ANGELUCCI, Raccolta Pubbl. Chimiche, Biologiche e Mediche Istituto «Carlo Erba» per Ricerche terapeutiche 3, 19 (1960).