

average 1 000 000 cells/ml, with about 70% macrophages; no *Salmonellae* were seen in the macrophages. The cells were repeatedly washed in a saline solution, and then frozen. 3 ml of suspension of cellular material were then injected, immediately after it had been heated to 38 C, into the foot-pad of the hosts; two more injections were made, after 5 and 10 days, respectively.

Five days after the last injection into the foot-pad, the popliteal lymph node was taken; this was partly used for histological examination and partly dilacerated into a saline solution to obtain a cellular suspension. We observed histologically a reactive hyperplasia with plenty of pyroninophilic cells. By bringing the suspension of lymph node cells into contact with a *Ballerup Salmonellae* suspension, we observed agglutination of *Salmonellae* against lymphoid or transitional cells, and sometimes even in the medium. The agglutination was quite evident in the fresh state, but it could also be spotted in dried specimens stained by the Giemsa method. The agglutination test was positive after transfer of macrophages taken from the donor 5–10–15 days after the last immunizing injection.

To check the specificity of the test, it was repeated each time, using the suspension of popliteal lymph node cells from the host, and a bacterial suspension different from the one used to immunize the donor; we used in the controls a suspension of *B. subtilis*. No agglutination occurred in these controls, nor in other controls when the suspension of *Salmonellae* was brought into contact with a suspension of lymph node cells from an untreated animal. It must be emphasized that research with the usual methods of antibodies agglutinating the *Salmonellae Ballerup* in the serum of the recipient rabbits always gave negative or debatable results.

From the results of this research, we believe that there is an antibody activity in the popliteal lymph node cells of the host after injection of macrophagic material from the immunized donor into the foot-pad, and that this antibody activity is specific against the bacteria used to immunize the donor. It is therefore probable that the macrophages of the latter, after ingestion of the bacterial antigen, are capable of transferring an antigen action or an antigenic information action; this is possible even after the bacterial antigen is no longer microscopically visible in the macrophages. The antibody response in the host is nevertheless limited, and does not reach a hematic rate detectable by common serological methods. The agglutination test between popliteal lymph node cells of the host after transfer by injections into the foot-pad, and the bacteria used to immunize the donor, is useful in bringing to light such a subliminal antibody response.

Riassunto. Gli autori hanno iniettato nella zampa di conigli riceventi materiale macrofagico di essudato peritoneale di conigli donatori immunizzati con *Salmonellae* per via intraperitoneale; hanno poi osservato agglutina-zione *in vitro* fra cellule di linfonodo popliteo degli animali riceventi, e *Salmonellae* del ceppo usato per l'immunizza-zione. Gli autori ritengono quindi probabile che i macro-fagi abbiano la capacità di trasferire stimoli antigenici.

F. MOLLO, M. GOVERNA,
C. CITATI, and M. DELLEPIANE

Istituto di Anatomia e Istologia Patologica dell'Università di Torino (Italy), February 27, 1963.

Partielle Sprengung der Erythrocyten¹

TOMCSIK und LITSCHER² haben unlängst beschrieben, dass Hyaluronsäure in einem pH-Bereich von 2 bis 3,6 anstelle von Hämolyse eine Reihe überraschender Änderungen in der Erythrocytenstruktur hervorruft, von denen die wichtigsten sind: (a) augenblickliche, ruckartige Vergrößerung der Zelle, (b) plötzliche Sprengung des grössten Teiles des in Körnchen fixierten Hämoglobins, (c) Ruhestadium der nach der partiellen Sprengung zurückgebliebenen und in mehreren Schichten gespaltenen Membranen.

Wir konnten in der hämatologischen Literatur der letzten 60 Jahre keine ähnliche Beobachtung finden. Zu unserer Überraschung wurde aber genau vor 100 Jahren ein prinzipiell ähnliches Phänomen mit einer anderen Substanz entdeckt und in den folgenden 40 Jahren von zwei Autoren bestätigt.

HENSEN³ fand, dass nach Zugabe von Harnstoff die Erythrocyten quellen und ihre Membran «weicher» wird. Nach ROBERTS⁴ entstehen «macula» an der Erythrocyten-«Zellwand», wenn gesättigtes Rosanilinnitrat einer Erythrocytensuspension zugegeben wird. ROBERTS entdeckte vor 100 Jahren in der gleichen Arbeit ein hochinteressantes Phänomen nach Zugabe von Tannin: «pullulation» des Erythrocyteninhaltes; ein Phänomen, welches in gewissen Details wahrscheinlich der Hyaluronsäurewirkung entspricht. Kaliumferrocyanid, Magnesiumsulfat, Jod, Alkohol, Glycerin, Zucker, Gallussäure, Karbol, Atropin, Morphinumderivate, Gummi und Kaffeeinfusion waren unwirksam; Pikrinsäure verursachte weniger deutliche Änderungen als Rosanilinnitrat. KOLL-

MANN⁵ bestätigte die Befunde von ROBERTS mit 0.5% Tannin. Teilerscheinungen (wahrscheinlich Membranspalten) erhielt er auch mit 15% Harnstofflösung. WEIDENREICH⁶ beschrieb und illustrierte mit dem Zeißschen Zeichenapparat die Wirkung einer 3/4prozentigen Tanninlösung auf Erythrocyten. Nach Erweiterung der «Erythrocyten-Hülle» erfolgte ihr Platzen und dann erschien ganz plötzlich die zuerst von ROBERTS beobachtete «pullulation» des Zellinhaltes. WEIDENREICH beobachtete gewisse Teilerscheinungen der Tanninwirkung auch bei Verwendung von Pikrinsäure und von Jodsäure.

Manche Ausdrücke der hier zitierten älteren Arbeiten über Erythrocyten sind heute unverständlich oder mindestens unklar. Die Existenz von «Stroma» und diejenige einer echten oder künstlichen Membran, die Glockenform und Isotonie der Erythrocyten wurden ausgiebig diskutiert; doch scheint es wahrscheinlicher zu sein, dass 0,5 bis 1% Tanninlösung ein prinzipiell ähnliches Phänomen an Erythrocyten auslöst, wie wir es vor kurzem mit Hyaluronsäure beobachtet haben. Der Zweck der vorliegenden Arbeit ist, die Wirkung der Hyaluronsäure mit derjenigen des Tannins zu vergleichen.

Die Methoden und Materialien wurden bereits in unserem ersten Bericht² beschrieben.

¹ Diese Arbeit wurde von der H.-Buss-Stiftung (Basel) unterstützt.

² J. TOMCSIK und EDITH LITSCHER, Proc. Soc. exp. Biol. Med., im Druck.

³ HENSEN, Z. wiss. Zool. 11, 253 (1862).

⁴ W. ROBERTS, Quart J. micr. Sci. 3, 170 (1863).

⁵ J. KOLLMANN, Z. wiss. Zool. 23, 463 (1874).

⁶ F. WEIDENREICH, Arch. mikr. Anat. 61, 459 (1902).

Resultate. Seit unserem ersten Bericht konnten wir in zahlreichen Beobachtungen an gewaschenen Schaf-, Rinder-, Pferde- und menschlichen Erythrocyten bestätigen, dass hochpolymerisierte Hyaluronsäure (0,5%) in physiologischem NaCl gelöst, in ganz regelmässiger Reihenfolge das Phänomen hervorruft. Unwesentliche Modifikationen wurden beobachtet in McIlvain-Pufferlösung, wenn das pH zwischen 2 und 3,6 verschoben wurde. Bei pH 4, bzw. bei höheren pH-Werten, konnte das Phänomen nicht mehr ausgelöst werden. Bei geringerer Konzentration als 0,1% Hyaluronsäure, konnte die Vergrösserung der Erythrocyten, aber keine typische Sprengung der Zelle, keine typische Spaltbildung der Membran beobachtet werden. Die enzymatischen Spaltprodukte der Hyaluronsäure waren, selbst bei optimalem pH, unwirksam. Ausser einem optimalen pH-Bereich ist somit hochpolymerisierte Hyaluronsäure – in genügend hoher Konzentration – zur Auslösung des Phänomens notwendig.

Unmittelbar nachdem 0,5% Hyaluronsäure zu einer 1prozentigen Erythrocytensuspension im mikroskopischen, feuchten Präparat durch Kapillarität zum Einsaugen gebracht wurde, erfolgt eine ruckartige Vergrösserung der Zellen (Figur 2, 3). Abhängig vom pH einerseits, von der Konzentration der Hyaluronsäure andererseits, entstand in 1–10% der Erythrocyten eine konzentrische Ringstruktur (Figur 2). Die äusserst scharfen, regelmässigen Phasenkontrastbilder erweckten den Eindruck einer zonenweise erfolgten Hämoglobinfällung. Ähnliche Bilder wurden in fixierten und gefärbten Präparaten bereits früher publiziert⁷. Die Mehrzahl der vergrösserten Erythrocyten wird im Phasenkontrast dunkel und in der Form unregelmässig (Figur 3) oder zitronenähnlich. Diese Zellen können eine Retraktion der Hämoglobinmasse zeigen (Figur 3). Die nächste Phase erfolgt augenblicklich, ohne sichtbare Einleitung, wie der Ausbruch eines Vulkans, meistens 10 bis 60 sec nach dem Kontakt der Erythrocyten mit der Hyaluronsäure. Den ausgeschleuderten Steinen und Lavastücken entsprechen viele Hunderte von festen Hämoglobinkörnchen (Figur 4). Die ganze Explosion ist in wenigen Sekunden abgeschlossen; die gesprengten und freigesetzten Hämoglobinkörnchen zeigen eine lebhaft Brownsche Molekularbewegung. Nur ein kleinerer Teil des Hämoglobins bleibt in den fast leer gewordenen, aber im Phasenkontrast noch immer gut sichtbaren Membranspalten zurück. Hämoglobinschollen bzw. mehrere kleinere Kugeln oder eine grosse kompakte Kugel können in sekundären Knospen nach der Sprengung des Hämoglobins in der äusseren Schicht der Membran nachgewiesen werden (Figur 7, 8). Die nach der Sprengung des Hämoglobins entstandenen mehr oder weniger sichelförmigen Membranspalten sind immer leer und im Phasenkontrast deutlich lichtbrechend (Figur 5, 6). Die äussersten Membranknospen sind kugelförmig, sie sitzen direkt auf der inneren Membran bzw. auf den lichtbrechenden Spalten (Figur 7) oder aber sie sind mit der Membran durch einen Stiel verbunden (Figur 8). Die Knospen sind häufig mit dichten, grossen, rosagefärbten Hämoglobinkugeln gefüllt; seltener sind sie leer (Figur 8).

Die sekundär entstandenen Membranspalten und Knospen lassen die Vermutung aufkommen, dass die Erythrocytenmembran mindestens aus drei Schichten besteht, die mit einem geeigneten Verfahren voneinander zu trennen sind.

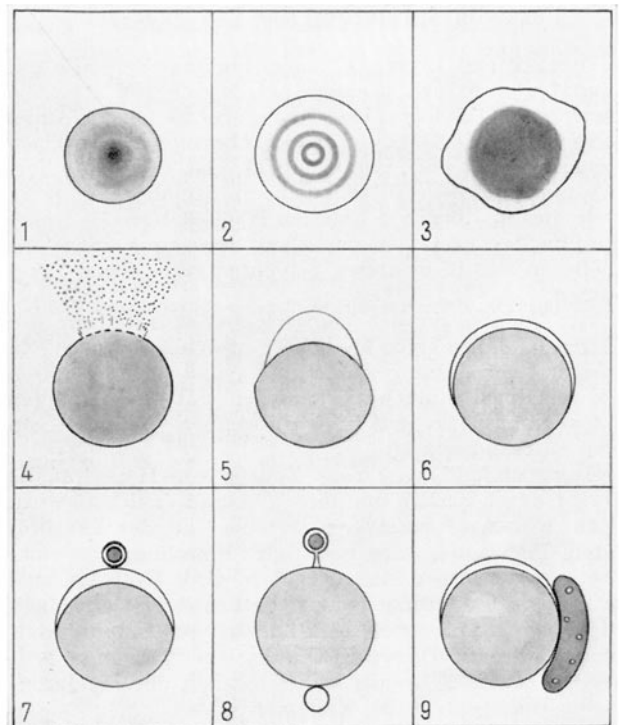
Wenn die Hyaluronsäure in einer Pufferlösung von höherem pH (3,2 bis 3,6) aufgelöst wurde, erhielten wir häufig kleinere oder grössere nierenförmige vakuolisierte Massen (Figur 9), die dicht an die äussere Oberfläche der Erythrocytenmembran angeschmiegt waren. Diese Massen

mögen einem fixierten Gemisch von gelösten Membranzubstanzen mit Hämoglobin entsprechen.

Wenn wir 0,5% Lösung des kommerziellen Tannins entweder ohne Änderung des pH in 0,85% NaCl-Lösung oder in McIlvain-Pufferlösungen im pH-Bereich 2 bis 3 hergestellt haben, erhielten wir weniger klar, aber in gewissen Details ähnlich wie mit 0,5% Hyaluronsäure, charakteristische Änderungen an der Zellstruktur der Erythrocyten. Die vulkanartige Sprengung der Erythrocyten erfolgte nicht so heftig wie mit Hyaluronsäure. Die voneinander isolierten, Brownsche Molekularbewegung aufweisenden Hämoglobinkörnchen fehlten; vielmehr blieb die von den Blutkörperchen freigesetzte Hämoglobinmasse an der äusseren Oberfläche der Membran kometenartig fixiert. Die in den Membranen erscheinenden stark lichtbrechenden Spalten waren aber ähnlich, sowohl bei Tannin als bei Hyaluronsäure. Bei pH 4 und bei höherem pH wurde auch die Tanninreaktion aufgehoben. Harnstoff, Jodsäure erzeugten nur Teilreaktionen.

Hyaluronsäure, aber auch Tannin erzeugen somit an verschiedenen Erythrocyten eine Reihe von Änderungen, die mit Tannin von ROBERTS genau vor 100 Jahren entdeckt bzw. grösstenteils vermutet wurde. Die volle Reihenfolge der äusserst regelmässigen Reaktion kann, wie wir es beobachtet haben, mit Hyaluronsäure erzeugt werden; sie gewährt einen tiefen Einblick in die Zellstruktur der Erythrocyten. Die volle Reihenfolge der Reaktion kommt in einem pH-Bereich von 2 bis 3,6 zustande, wenn eine X-Substanz in genügender Konzentration vorhanden ist. Wir untersuchen zur Zeit, welche Stoffe ausser der Hyaluronsäure und des Tannins als X-Substanz fungieren können.

Summary. Highly polymerized hyaluronic acid coagulates the hemoglobin of several erythrocytes. The erythrocytes with coagulated hemoglobin do not hemolyze at



⁷ M. RAUCHENBERG, Folia haematol. 77, 396 (1960).

pH 2 to 3.6, but very soon explode and set free within 1 or 2 sec hundreds of hemoglobin granules. The remaining membranes retain some of the hemoglobin and reveal several splits after the termination of the explosion. Judging from the splits, three layers of erythrocyte-membrane could be surmised. 0.5% tannic acid elicits a

similar but less clear-cut phenomenon without a typical 'explosion'.

EDITH LITSCHER und J. TOMCSIK

Hygiene Institut der Universität Basel (Schweiz),
4. Juli 1963.

The Alkaloids of *Aspidosperma discolor* A. DC.^{1,2}

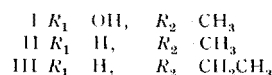
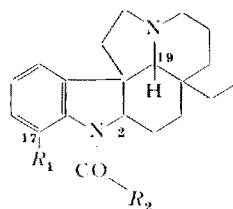
In a recent communication³ DASTOOR and SCHMID reported the isolation from *Aspidosperma discolor* A. DC. of isoreserpiline, reserpiline, isoreserpiline- ψ -indoxyl, yohimbine, 10-methoxydihydrocorynantheol⁴, and $\Delta^{15,20}$ -dehydro-10-methoxydihydrocorynantheol⁴. Attention was drawn to the fact that no aspidospermine-type alkaloids were encountered and it was suggested that the presence of indolic and related alkaloids, as distinct from dihydroindolic compounds, might be characteristic of the subdivision *Nitida* of the genus *Aspidosperma*.

We have already reported earlier⁵ on the isolation of isoreserpiline from this plant (trunk bark) and we should now like to record the presence of three alkaloids of the aspidospermine type, namely: demethylaspidospermine (I), demethoxyaspidospermine (II), and demethoxypalosine (III). This shows that the assumed³ chemotaxonomic conclusions with regard to the supposed absence of such alkaloids is not justified. All three alkaloids were extracted by chloroform from a 10% acetic acid solution of the total bases, and subsequently separated by repeated chromatography on neutral alumina. The oily demethylaspidospermine (I)^{6,7} was characterized as its crystalline perchlorate, $C_{21}H_{28}N_2O_2 \cdot HClO_4 \cdot MeOH$, m.p. 170° (dec.); $[\alpha]_D^{25} + 94^\circ$ (c, 0.98 in methanol). The free base had ultraviolet absorption (λ_{max}^{EtOH} 220, 258 and 293 m μ , log ϵ 4.39, 3.52, 3.20; $\lambda_{max}^{EtOH-KOH}$ 307 m μ , log ϵ 3.97), and infrared absorption (λ_{max}^{KBr} 6.17, 6.29, 6.38 μ), characteristic of a 17-hydroxy- N_α -acyldihydroindole (aspidospermine numbering) while the n.m.r. spectrum⁸ was entirely consistent⁹ with structure I (CH_2CH_3 , 0.72 δ , triplet; $C_{19}-H$, 2.28 δ , singlet; $N_\alpha-COCH_3$, 2.32 δ , singlet; $C_{17}-OH$, 10.83 δ , singlet; C_2-H , 4.07 δ , quartet, $J = 6$ and 10 cps.; 3 aromatic protons, 6.9 δ , multiplet). This structure was fully confirmed by mass spectrometry¹⁰ (molecular ion at m/e 340 as well as peaks at m/e 28 and m/e 124, typical¹¹ of the aspidospermine skeleton) and by methylation with dimethyl sulfate to (–)-aspidospermine, identical with the natural alkaloid (by mixture m.p., IR, UV and thin-layer chromatography).

The previously unknown amorphous demethoxyaspidospermine (II)⁷ was isolated as its perchlorate, $C_{21}H_{28}N_2O \cdot HClO_4 \cdot 0.5H_2O$, $[\alpha]_D^{25} + 21^\circ$ (c, 1.3 in methanol). The free base, $[\alpha]_D^{25} - 15^\circ$ (c, 1.8 in chloroform), showed ultraviolet absorption (λ_{max}^{EtOH} 253, 280, 289 m μ , log ϵ 4.12, 3.58, 3.52) characteristic of an N -acyldihydroindole unsubstituted in the benzene ring. The NMR spectrum again showed the absorptions characteristic⁹ of the aspidospermine skeleton (CH_2CH_3 , 0.73 δ , triplet; $N_\alpha-COCH_3$, 2.27 δ , singlet; C_2-H , 4.08 δ , quartet, $J = 6$ and 10 cps.) the four aromatic protons absorbing as a one-proton multiplet at 8.13 δ ($C_{17}-H$) and a three-proton multiplet at 7.17 δ .

Structure II was confirmed by the mass spectrum¹⁰ which differed from that of aspidospermine¹¹ only in the appearance of those peaks which contain the benzene ring at mass numbers thirty units lower.

Demethoxypalosine (III) was similarly identified by its mass spectrum and by direct comparison with a specimen isolated¹² from *A. limae* Woodson.



Preliminary investigation has shown the presence of several other alkaloids in *A. discolor*, and these are the subject of continuing studies in our laboratories.

Zusammenfassung. Von *Aspidosperma discolor* A. DC. wurden drei Alkaloide (I, II, III) der Aspidospermin-Art isoliert, deren Struktur durch massenspektroskopische und Kernresonanzmessungen bewiesen wurde.

J. M. FERREIRA¹³, B. GILBERT,
R. J. OWELLEN, and C. DJERASSI

Department of Chemistry, Stanford University, Stanford
(California, U.S.A.) and Instituto de Química Agrícola,
Rio de Janeiro (Brazil), August 19, 1963.

¹ Paper XLIII in the series *Alkaloid Studies*. For paper XLII see K. S. BROWN, H. BUDZIKIEWICZ, and C. DJERASSI, *Tetrahedron Letters*, in press.

² Financial assistance in support of the joint research effort on Brazilian plants between Stanford University, the Instituto de Química Agrícola and the Universidade do Brasil was provided by the Rockefeller Foundation. Additional financial aid from the National Institutes of Health (grant No. 5 TI GM-682) is gratefully acknowledged. We also thank Dr. D. DA ANDRADE LIMA and Mr. A. SARMENTO for assistance in collection and identification of the plant material.

³ N. DASTOOR and H. SCHMID, *Exper.* 19, 297 (1963).

⁴ These two alkaloids have been encountered by us in other *Aspidosperma* species.

⁵ B. GILBERT, J. AGUAYO BRISOLESE, N. FINCH, W. I. TAYLOR, H. BUDZIKIEWICZ, J. M. WILSON, and C. DJERASSI, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 1523 (1963). See also footnote 5 in ³. *A. discolor* was collected in the Dois Irmãos forest, Recife (Brazil).

⁶ B. WITKOP and J. B. PATRICK, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 5603 (1954).

⁷ Also isolated by us from *Aspidosperma churcunum* Fr. All.

⁸ Measured by Dr. LOIS DURHAM in $CDCl_3$ solution (chemical shift reported in δ units with tetramethylsilane = 0.0 δ) using a Varian A-60 spectrometer.

⁹ C. DJERASSI, A. A. P. G. ARCHER, T. GEORGE, B. GILBERT, J. N. SHOOTERY, and L. F. JOHNSON, *Exper.* 16, 532 (1960). — C. DJERASSI, H. W. BREWER, H. BUDZIKIEWICZ, O. O. ORAZI, and R. A. CORRAL, *J. Amer. chem. Soc.* 84, 3480 (1962).

¹⁰ We are indebted to Drs. H. BUDZIKIEWICZ and J. M. WILSON for these measurements.

¹¹ K. BIEMANN, M. FRIEDMANN-SPITELLER, and G. SPITELLER, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 631 (1963).

¹² J. AGUAYO BRISOLESE, C. DJERASSI, and B. GILBERT, *Chem. and Ind.* 1962, 1949.

¹³ Recipient of a fellowship from the International Cooperation Administration under a program administered by the U.S. National Academy of Sciences.