

markable processes or pseudopods. This observation was made having examined several hundreds of platelets in each group. Some small infoldings of the cell membrane or limiting membrane were seen. The granulomere exhibited the usual organelles: α -granulomeres with homogenous ground substance, rather rare β -granulomeres or mitochondria, γ -granulomeres or microvesicles, and δ -granulomeres or vacuoles. Agranular membranes, representing either a part of Golgi complex or poorly developed endoplasmic reticulum, were observed.

In the present experiment, the administration of reserpine did not result in any alterations in the ultrastructure of the platelets, except that they seemed to be somewhat swollen (Figure, B). In contrast, the administration of chlorpromazine affected the platelets seriously (Figure, C). In most of the cases the limiting membrane was broken and the cytoplasmic material was leaking through this gap. At the same time, the easily vulnerable cytoplasmic organelles seemed to remain quite intact both inside and outside the platelet.

Discussion. Our observations on the ultrastructure of the normal rabbit platelet are well in accord with those reported in the rather extensive literature published since the pioneer works of RINEHART¹¹ and BERNHARD and LEPLUS¹². For references the reader is referred to BRAUNSTEINER¹³.

This work has shown that in blood platelets, at least *in vitro*, chlorpromazine produces structural changes, which can explain the 5HT releasing action of this agent. Chlorpromazine has been supposed to increase the permeability of the limiting membrane of platelets³. The ability of chlorpromazine to reduce the packed platelet volume⁶ is conceivably connected with its deleterious effect on the cell membrane, clearly seen in electron micrographs, and thus providing direct evidence of the mode of action of this compound on platelets. Although the platelets had

lost almost all their 5HT content, the electron micrographs showed that a considerable part of cytoplasm was still inside the platelet. This may indicate that chlorpromazine has an open way to affect also the membranes of cytoplasmic organelles and that it allows a rapid liberation of the stored amine. In fact, *in vivo* chlorpromazine seems primarily to act on the intracellular particles of rat brain. It decreased the ratio of particulate/supernate 5HT without decreasing the total amine⁷.

Reserpine, on the other hand, produced no such morphological changes in the structure of platelets. This is in accord with the assumption that reserpine liberates 5HT from platelets by blocking the active amine transport, which maintains the high concentration of amine inside the cell¹⁴.

Zusammenfassung. Chlorpromazin und Reserpin verursachen 5HT-Freisetzung von Thrombocyten. Chlorpromazin verursacht auch morphologische, elektronenoptisch sichtbare Veränderungen der Thrombocyten.

A. TELKKÄ, M. NYHOLM, and M. K. PAASONEN

Electron Microscope Laboratory and Department of Pharmacology, University of Helsinki (Finland), June 10, 1963.

¹ J. F. RINEHART, *Amer. J. clin. Path.* 25, 605 (1955).

² W. BERNHARD and R. LEPLUS, *Schweiz. med. Wschr.* 85, 897 (1955).

³ H. BRAUNSTEINER, in S. A. JOHNSON, R. W. MONTGOMERY, J. B. REBUCK, and R. C. HORN, *Blood Platelets* (London 1960), p. 617.

⁴ F. B. HUGHES and B. B. BRODIE, *J. Pharmacol. exp. Therap.* 127 96 (1959).

Über die Bindung der Ca-Ionen an das Na⁺+K⁺-aktivierbare Adenosintriphosphatase-System des Gehirns

Die Ca-Ionen spielen in der Zellmembrantätigkeit sehr wahrscheinlich eine wesentliche physiologische Rolle. Es ist bekannt, dass ein grosser Teil des Ca-Gehalts der Zellen in der Zellmembran lokalisiert ist¹. Mehrere Angaben sprechen für eine Hemmung der Membranpermeabilität durch Ca-Ionen¹⁻³. Besondere Beachtung verdient in diesem Zusammenhang die Na⁺-K⁺-ATPase⁴. Dieses Enzymsystem ist nämlich in der Zellmembran lokalisiert und kann durch Ca-Ionen stark gehemmt werden⁵⁻⁹.

Die Na⁺-K⁺-ATPase wurde aus Rattenhirn durch Zellfraktionierung dargestellt¹⁰. Die ATP-spaltende Aktivität wurde in einem aus 50 mM Tris¹¹-HCl-Puffer von pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-ATP bzw. 100 mM NaCl und 20 mM KCl bestehenden Reaktionsgemisch bestimmt. Nach Ablauf der Inkubation (10 min, 37°C) wurde die Bestimmung des anorganischen Phosphats aus dem proteinfreien Filtrat nach LOHMANN und JENDRASSIK durchgeführt¹². Die in der Tabelle dargestellte ATPase-Aktivität ist definiert als die Differenz aus (ATPase-Aktivität gemessen in Anwesenheit von Mg⁺⁺ + Na⁺ + K⁺) und (ATPase-Aktivität in Anwesenheit von Mg⁺⁺ allein).

Ca-Ionen beeinflussen die nur mit Mg⁺⁺ oder mit Mg⁺⁺ + Na⁺ gemessene Aktivität gar nicht, sie hemmen

jedoch eindeutig die in Gegenwart von Mg⁺⁺ + Na⁺ + K⁺ bestimmte Enzymaktivität. Die halbmaximale Hemmung durch Ca-Ionen wurde in einer Konzentration von 0,5 mM festgestellt.

Um zu entscheiden, wie die Hemmung durch Ca-Ionen zustande kommt, prüften wir eine fragliche Bindung der Ca-Ionen durch das Enzympräparat. Es wurden Versuche in Anwesenheit von Citrat, Oxalat bzw. ÄDTA¹³ mit einer 0,5 mM Ca-Konzentration durchgeführt. Die Ca-Ionen wurden entweder unmittelbar dem Reaktionsgemisch zugegeben, oder das Enzympräparat wurde mit

¹ A. M. SHANES, *Pharmacol. Rev.* 10, 59 (1958).

² B. FRANKENHÄUSER und A. L. HODGKIN, *J. Physiol.* 137, 218 (1957).

³ W. J. ADELMAN JR. und J. C. DALTON, *J. gen. Physiol.* 43, 609 (1960).

⁴ Na⁺ + K⁺-ATPase, Na⁺ + K⁺ aktivierbares Adenosintriphosphatase-System.

⁵ J. C. SKOU, *Biochim. biophys. Acta* 23, 394 (1957); 42, 6 (1960).

⁶ A. SCHWARTZ, H. S. BACHELARD und H. McILWAIN, *Biochem. J.* 84, 626 (1962).

⁷ W. N. ALDRIDGE, *Biochem. J.* 83, 527 (1962).

⁸ J. JÄRNEFELT, *Biochim. biophys. Acta* 59, 643 (1962).

⁹ J. F. HOFFMAN, *Circulation* 26, 1201 (1962).

¹⁰ J. SOMOGYI und S. VINCZE, *Acta physiol. hung.* 20, 325 (1961).

¹¹ Tris, Tris (hydroxymethyl)-aminomethan.

¹² K. LOHMANN und L. JENDRASSIK, *Biochem. Z.* 178, 419 (1926).

¹³ ÄDTA, Äthylendiamin-tetraessigsäure.

so viel Ca^{++} vorinkubiert, dass die Endkonzentration der mit dem Enzympräparat in den Ansatz gebrachten Ca -Ionen 0,5 mM war.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, bleibt die Ca -Hemmung bestehen, wenn das Reaktionsgemisch Ca^{++} und Citrat im Verhältnis von 1:10 enthält. Dagegen wird die Ca -Hemmung durch Oxalat beseitigt, da das Ca^{++} als Ca -Oxalat gefällt wird. Wird aber das Ca^{++} mit dem Enzympräparat vorinkubiert und anschliessend dem Ansatz zugegeben, so

bleibt die Hemmung auch in Anwesenheit von Oxalat erhalten.

Es folgt daraus, dass die Ca -Ionen während der Vorinkubierung an das Enzym gebunden und durch Oxalat davon nicht entfernt werden können.

Die Ca -Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase in Gegenwart von ÄDTA hängt von der ÄDTA -Konzentration ab. Es ist quantitativ unerheblich, ob das Reaktionsgemisch unmittelbar oder durch das Enzympräparat mit Ca -Ionen beschickt wird. Die Ca -Hemmung ist noch beträchtlich, wenn die molare Konzentration von ÄDTA gleich der der Ca -Ionen ist. Der Enzympräparat- Ca -Komplex scheint recht stabil zu sein, da, bezogen auf die Ca -Konzentration, die 10fache Konzentration von Oxalat gar nicht, die zweifache Menge von ÄDTA nur teilweise das Ca^{++} vom Enzympräparat ablösen kann.

Es wäre vorstellbar, dass die Ca -Ionen möglicherweise durch den Einfluss auf das Na^+/K^+ -ATPase-System eine regulatorische Rolle im aktiven Ionentransport spielen.

Die Wirkung von Citrat, Oxalat bzw. ÄDTA auf die Ca -Hemmung des Na^+/K^+ aktivierbaren ATPase-Systems

CaCl_2	ATPase-Aktivität ($\mu\text{Mol P}/10 \text{ min}$ abgespalten)		
	Im Reaktionsgemisch abwesend anwesend		Im vorinkubierten Enzympräparat
1. Kontrolle	1,10	0,56	–
+5 mM Citrat	1,14	0,63	–
2. Kontrolle	1,11	0,57	0,55
+5 mM Oxalat	1,12	1,13	0,47
3. Kontrolle	1,01	0,48	0,45
+0,25 mM ÄDTA	1,08	0,66	0,49
+0,5 mM ÄDTA	1,10	0,87	0,75
+1,0 mM ÄDTA	1,11	0,98	0,89

Ca -Konzentration: 0,5 mM. Proteingehalt: 0,2 mg/Ansatz.

Summary. Ca^{++} , being bound to the sodium-potassium-stimulated ATPase-system of the brain, inhibits this system. It can only partially be removed by EDTA. It cannot be removed by oxalate.

J. SOMOGYI

Experimentelle Forschungsabteilung der Medizinischen Universität Budapest (Ungarn), 8. Oktober 1963.

Mitocondri, zone del Golgi e globuli vitellini negli ovociti in accrescimento di *Planorbis corneus* L. (Moll. Gast. Polm.)

Precedenti indagini¹⁻³ sugli ovociti di alcune specie di Molluschi e di Echinodermi avevano consentito di stabilire come la formazione dei globuli vitellini avvenisse per aggregazione di particelle proteiche (di probabile natura ribosomiale) esistenti nel citoplasma o in forma «libera» o in forma «legata» a citomembrane. Era stato anche osservato⁴, negli ovociti di *Patella coerulea* e di *Aplysia depilans*, come le zone del Golgi si rivelassero attorno ai globuli vitellini durante la fase della loro costituzione, tanto da non potere più essere poste in evidenza a vitellogenesi ultimata. Si era pertanto ritenuto che, almeno negli ovociti, le zone del Golgi fossero relative ad una determinata condizione fisico-chimica connessa con i processi di sintesi della vitellogenesi.

In base alle ricerche eseguite da FAVARD e CARASSO⁵ e da uno di noi⁶, era risultato che negli ovociti di *Planorbis corneus* la formazione dei globuli vitellini potesse avvenire pure per trasformazione dei mitocondri. I due autori francesi avevano anche ammesso che gli stessi globuli avessero una origine più complessa con l'entrata in giuoco di porzioni di citoplasma comprendenti o no dei mitocondri, e limitate da lamine ergastoplasmatiche senza granulazioni.

Era quindi interessante non solo confermare l'origine mitocondriale dei globuli vitellini di *Planorbis*, ma anche di vedere se effettivamente, durante la costituzione di

essi, si svelassero le zone del Golgi. A tale scopo sono state compiute ricerche al microscopio ottico su preparati fissati in Bouin-Hollande e in Helly e colorati con i metodi MALLORY e GALGANO I⁶; le osservazioni sul condrioma sono state eseguite su preparati fissati in Regaud e colorati con ematossilina ferrica di Heidenhain, nonché su preparati allestiti secondo la tecnica di Altmann-Kull, quelle sulle zone del Golgi su preparati allestiti con i metodi di Da Fano (al nitrato di argento) e Kolatschew (al tetrossido di osmio). Sono state eseguite altresì osservazioni al microscopio elettronico su preparati fissati in soluzione di tetrossido di osmio all'1% tamponata secondo Palade, ed inclusi in miscela di n-metacrilato di metile e n-metacrilato di butile.

Nel periodo previtellogenetico si può rilevare che nel citoplasma si trova un insieme di granuli molto fini sparsi in pressochè tutta la sua area. Durante l'intero periodo vanno man mano aumentando di numero fino a raggiungere la massima concentrazione al termine di esso. Nel

¹ A. BOLOGNARI, Nature 186, 490 (1960).

² A. BOLOGNARI, Atti Soc. Peloritana Sci. Fis. Mat. Nat., Messina 6, 55 (1960).

³ A. BOLOGNARI, Boll. Zool. 28, 597 (1961).

⁴ A. BOLOGNARI, Nature 186, 565 (1960).

⁵ P. FAVARD e N. CARASSO, Arch. Anat. Micr. 47, 211 (1958).

⁶ M. GALGANO, Rend. Acc. Naz. Lincei, Cl. Sci. Fis. Mat. Nat., Ser. 8 3, 629 (1947).