

The immunological reactions indicated with an apostrophe refer to the corresponding numbers of the electrophoretic runs. Besides each bird examined, the immunoelectropherogram of *Sturnus vulgaris* (starling) was represented (s) to allow a comparison with the most complete immunological reaction. d = dextran (rel. mob. = 0); a = human serum albumin (rel. mob. = 1); ag = antiserum groove; ig = insertion groove; α = α -crystallin.

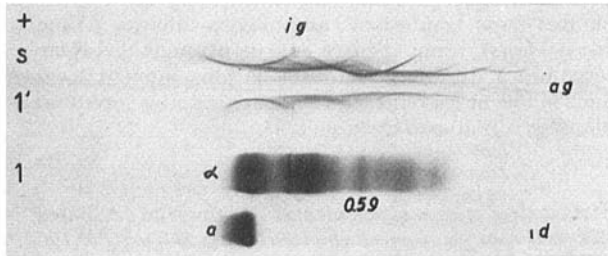


Fig. 1. In a Passeriform lens pherogram, characterized by the 0.60 fraction which is found, for instance, in *Accipiter nisus* (sparrow hawk), almost all components give an individual precipitation line

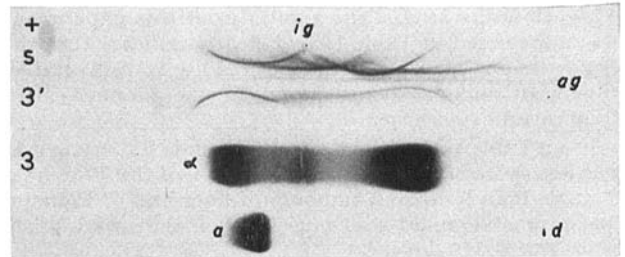


Fig. 3. Immunoelectropherogram of *Sula bassana* (gannet). Besides the one of the α -crystallin, the simple reaction shows a characteristically curved precipitation line.

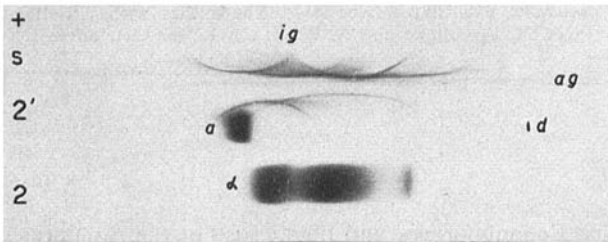


Fig. 2. Immunoelectropherogram of *Cochlearius cochlearius* (boat-bill heron) showing the Anseriform type: a long extended fused precipitation line corresponding probably, as in ducks, to the multiple antigens of the FISC (RABAËY⁵).

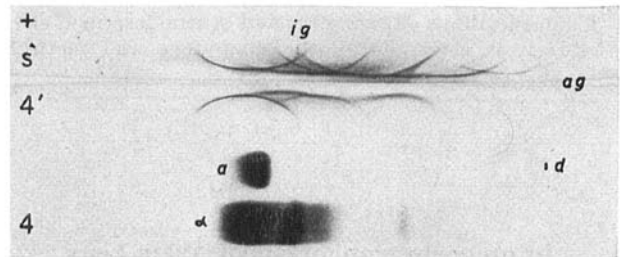


Fig. 4. Among other types, *Cuculus canorus* (European cuckoo) represents an apparent reduced lens pherogram, the less visible components of which, however, are revealed by a more complete immunological reaction.

of glycogen in its lens⁵. While all Charadriiform lenses contain glycogen, it is not found with Sphenisciformes and 'Pelecaniformes' (i.e. gannets and cormorants, for *Pelecanus* has a glycogen-positive, heron-like lens pherogram, and perhaps should rather fit in the Ciconiiformes; cf. the old conception of GADOW, 1893⁶). More detailed reports upon this matter will soon be published elsewhere⁷.

Zusammenfassung. Mit Immunelektrophorese und Mikro-Agarelektrophorese werden die Linsenproteine verschiedener Vogelgruppen untersucht. Der Vergleich der Reaktion der Linsenextrakte mit anti-Star-Antiserum erlaubt nicht nur Rückschlüsse auf die Verwandtschaft mit den Singvögeln; auf Grund ihrer ähnlichen Reaktion

kann auch die gegenseitige Verwandtschaft der untersuchten Arten beurteilt werden.

H. GYSELS

Instituut voor Dierkunde-Systematiek, Rijksuniversiteit Gent (Belgium), November 1, 1963.

⁵ M. RABAËY, *Nature* 198, 206 (1963).

⁶ H. GADOW, in BRONN's *Klassen und Ordnungen des Tierreichs*, Vögel II (1893).

⁷ *Acknowledgments.* I wish to thank Professors Dr. L. DE CONINCK, J. M. DENUÉ and M. RABAËY for their most critical survey of this work, both on the taxonomic and the biochemical plan.

Azione dell'«Epidermal Growth Factor» sulla sintesi di acidi nucleici e proteine dell'epitelio cutaneo¹

È di recente acquisizione il fatto che la crescita e la differenziazione di alcuni tipi cellulari è direttamente influenzata e regolata da specifici «growth factors». Il primo di questi fattori ad essere individuato e caratterizzato nella sua struttura, agisce selettivamente sulle cellule nervose simpatiche ed è riportato nella letteratura come

NGF (LEVI-MONTALCINI e COHEN²; LEVI-MONTALCINI e ANGELETTI³). Più recentemente è stato isolato un altro fattore; che agisce stimolando specificamente la crescita

¹ Il presente lavoro è stato realizzato con fondi del NIH e della Merck Sharp-Dohme Co.

² R. LEVI-MONTALCINI e S. COHEN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 85, 324 (1960).

³ R. LEVI-MONTALCINI e P. U. ANGELETTI, *Quart. Rev. Biol.* 36, 99 (1961).

degli epiteli cutanei ed i processi di cheratinizzazione (COHEN^{4,5}). Analogamente all'NGF, anche questo fattore di crescita della pelle appare essere di natura proteica e si trova in alta concentrazione nella ghiandola salivare del topo maschio, da dove può essere estratto e purificato.

La iniezione di piccole quantità di questa proteina determina un rapido accrescimento di tutto l'epitelio cutaneo e marcato ispessimento dello strato cheratinoso.

Nel presente lavoro è stato studiato l'effetto di questo fattore (denominato EGF = epidermal growth factor), sulla sintesi degli acidi nucleici, proteine e di alcune attività enzimatiche della epidermide.

Parte sperimentale. L'estrazione e la purificazione della proteina biologicamente attiva erano eseguite secondo la procedura descritta altrove in dettaglio; in tutti gli esperimenti qui riportati è stata usata una preparazione di «epidermal growth factor» (EGF), purificata sino alla eluzione attraverso colonna di Sephadex G 75 (COHEN⁴).

Per ogni esperimento, rattini appena nati erano iniettati ogni giorno s.c., con EGF in soluzione acquosa, nella quantità di 2 µg/g di peso corporeo e per la durata di 5 giorni.

Per ogni esperimento erano usati animali da stessa nidiata, metà dei quali venivano usati come controllo e l'altra metà sottoposta al trattamento con EGF. Al termine del trattamento gli animali erano sacrificati per decapitazione e la cute era immediatamente rimossa e distesa su appositi piani raffreddati costantemente a 3-4°C. Dalla pelle così distesa venivano quindi sezionate aree circolari del diametro di 2 cm, mediante una lama circolare appositamente costruita.

La separazione della epidermide dal derma si otteneva quindi incubando le sezioni di pelle in una soluzione diluita di tripsina (2%) in tampone Krebs-fosfato, per circa 30 min. Dopo tale trattamento la epidermide era facilmente separata dallo strato sottostante di derma, si lavava accuratamente in soluzione fisiologica e infine le sottili sezioni erano usate per le varie analisi chimiche.

Per la determinazione degli Acidi Nucleici, ogni pezzo di epidermide era estratto con acido tricloroacetico al 5% a 0°C, quindi lavato tre volte con miscuglio alcool-etere ed infine con etere.

I campioni così preparati erano quindi lasciati seccare alla temperatura di 50°C e quindi nuovamente estratti con TCA al 5% (2 ml per ogni campione), in un bagno termostato a 90°C per 15 min.

L'acido ribonucleico era determinato in aliquote di 0,2 cm³ di questo estratto usando la reazione all'orcinolo per i pentosi secondo il metodo di VOLKIN e COHN⁶, misurando la D.O. a 660 mµ in uno spettrofotometro Beckman DU.

Per ogni esperimento era fatta in parallelo una curva standard, con puro RNA (Sigma). Nel calcolo dei risultati si teneva conto di un fattore di correzione per il colore prodotto dal DNA nella reazione con l'orcinolo, dopo aver determinato che 7,4 µ di DNA davano una reazione equivalente a quella di 1 µg di RNA.

Per la determinazione del DNA si usava la reazione alla difenilamina per i desossi-pentosi, secondo il metodo di Disch e Schwarz, modificato da VOLKIN e COHN⁷, usando aliquote di 1 cm³ dell'estratto con TCA. La densità ottica dei campioni era letta a 540 mµ, in un Beckman DU; per ogni esperimento si determinava una curva standard, utilizzando una soluzione stock di DNA ottenuto dalla Sigma.

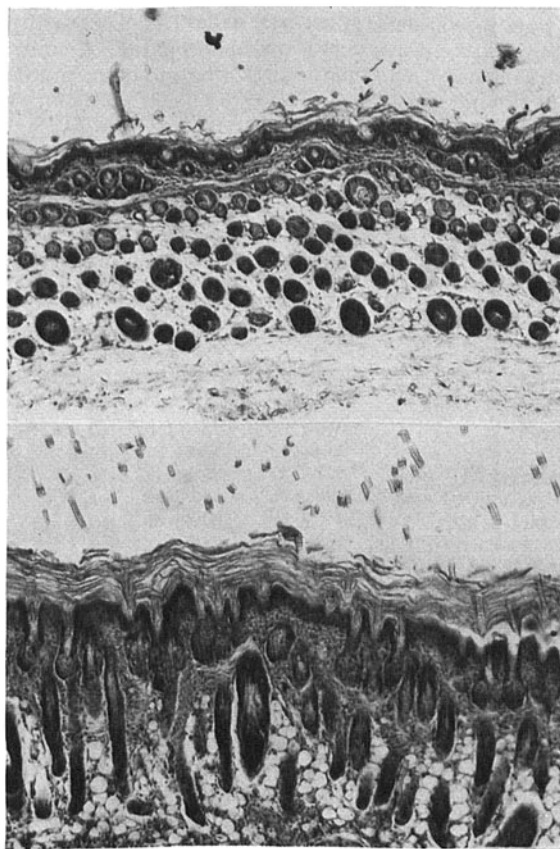
Per la determinazione dell'attività enzimatica, le sezioni di epidermide erano omogenizzate in NaCl al 0.9% (0.5 ml per ogni sezione di pelle di 2 cm di diametro). Gli omogenati erano centrifugati per 5 min a 3000 rpm, ed il

supernatante usato per le analisi. Gli enzimi presi in esame erano: fosfatasi acida, istidasi e deidrogenasi lattica.

Per la determinazione della fosfatasi acida è stato seguito il metodo di BESSEY et al.⁸, per la istidasi il metodo di TABOR e MEHLER⁹ e per la deidrogenasi lattica il metodo di KORNBERG¹⁰.

Per la determinazione del peso secco e dell'azoto totale, secondo il metodo di Kjeldahl, erano usate sezioni intere di epidermide (diametro cm 2), ottenute libere dal derma mediante tripsinizzazione.

Risultati e commento. L'iniezione del fattore di crescita della cute (EGF), nelle dosi sopra indicate, determina una rapida risposta degli epiteli cutanei già apparente al settimo giorno di trattamento, per la precoce eruzione dei



(Sopra) Sezione di cute di ratto a 5 giorni. (Sotto) Sezione di cute di ratto iniettato per 5 giorni con E.G.F. (2 µg/g). Em. Eos. 65 x.

⁴ S. COHEN, J. biol. Chem. 237, 1555 (1962).

⁵ S. COHEN e G. A. ELLIOT, J. invest. Derm. 40, 1 (1963).

⁶ E. VOLKIN e W. E. COHN, in *Methods of Biochemical Analysis* (Ed. D. GLICK, Interscience Publ. Inc., New York 1954), vol. I, p. 298.

⁷ E. VOLKIN e W. E. COHN, in *Methods of Biochemical Analysis* (Ed. D. GLICK, Interscience Publ. Inc., New York 1954), vol. I, p. 299.

⁸ D. A. BESSEY, O. H. LOWRY e M. J. BROCK, J. biol. Chem. 164, 321 (1946).

⁹ H. TABOR e A. H. MEHLER, in *Methods in Enzymology* (Ed. S. P. COLOWICK, N. O. KAPLAN, Acad. Press Inc., New York 1955), p. 228.

¹⁰ A. KORNBERG in *Methods in Enzymology* (Acad. Press Inc., New York 1955), vol. I, p. 441.

denti incisivi e per la precoce apertura della rima palpebrale, fenomeni entrambi dovuti alla cheratinizzazione dei rispettivi epitelii di rivestimento.

All'esame istologico l'iperplasia della cute negli animali trattati appare evidente e marcata ovunque, così come la ipercheratosi (Figura).

Nella Tabella sono riportati i risultati delle determinazioni degli acidi ribonucleico e desossiribonucleico nell'epidermide degli animali trattati e degli animali controllo. I valori sono espressi in termine di $\mu\text{g}/\text{Unità di area}$, essendo quest'ultima una sezione esattamente circolare di 2 cm di diametro.

Come si osserva, il trattamento con EGF determina un significativo aumento sia dell'RNA, come del DNA ed il rapporto tra il valore medio sperimentale e il valore medio di controllo risulta essere di 1,33 per il DNA e di 1,31 per l'RNA.

Ancora più sensibile appare invece l'aumento a carico del peso secco, come si osserva nella Tabella. Per il peso secco infatti, il rapporto tra sperimentale e controllo risulta essere 1,65, mentre il contenuto percentuale in azoto rimane invariato.

Nella Tabella infine, sono riportati i valori della determinazione di alcune attività enzimatiche; si osserva come nell'epidermide degli animali sperimentali la istidasi e la fosfatasi acida e la deidrogenasi lattica sono costantemente e marcatamente aumentate.

I risultati del presente lavoro dimostrano che l'iniezione di EGF stimola selettivamente l'accrescimento della epidermide, confermando le precedenti osservazioni morfologiche. L'effetto del fattore si riflette in un significativo aumento del contenuto di proteine ed acidi nucleici/unità di area di cute negli animali trattati; tale aumento appare particolarmente marcato (fuori del 100%), quando si considerano i valori relativi al peso secco/unità di area, fatto questo dovuto alla abbondante cheratinizzazione che si osserva negli animali sperimentali.

In conclusione, la iniezione sottocutanea di piccole dosi di EGF stimola vivacemente i processi di sintesi e di accrescimento delle cellule epiteliali della cute; il meccanismo attraverso il quale si verifica tale effetto rimane ancora da spiegare; la sua delucidazione potrà forse portare un notevole contributo alla chiarificazione di quei processi che regolano la crescita e la differenziazione cellulare.

Effetto dell'EGF sugli acidi nucleici, proteine ed enzimi della epidermide di ratto. Ogni valore rappresenta la media di 6 esperimenti

	Controlli	Sperimentali	Rapporto s.c.
Peso secco mg/unità di area ^a	9 ± 1,5	15 ± 1,4	1,65
N%	14,9	15,01	+1,0
DNA $\mu\text{g}/\text{unità di area}$	277 ± 21	371 ± 41	1,33
RNA $\mu\text{g}/\text{unità di area}$	529 ± 36	693 ± 86	1,31
Istidasi U/ml/h ^b	485 ± 59	849 ± 48	1,8
Fosfatasi acida U/ml/h	13,9 ± 1,5	24,5 ± 3,8	1,7
Lattico-deidrogenasi $\mu\text{M}/\text{ml}/\text{h}$	28,5 ± 2,6	41,3 ± 4,2	1,4

^a Unità di area = 3.14 cm². ^b Unità arbitrarie.

Summary. The biological effect has been investigated of a specific protein with a growth-stimulating activity on epidermal cells.

Injection of minute amounts of this factor (EGF) into newborn rats produces hyperplasia of the epidermis with a marked increase in the protein and nucleic acid content per unit of skin area. The activity of a number of epidermal enzymes per unit area is also increased by the epidermal growth factor.

P. U. ANGELETTI, M. L. SALVI,
R. L. CHESANOW e S. COHEN

Istituto Superiore di Sanità, Laboratori di Chimica Biologica e Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Cattolica S. Cuore, Roma (Italia), il 18 novembre, 1963.

The Measurement of the Renal Clearance of γ -Emitting Tracers by the Use of External Counting

Introduction. The renal clearance rate of substances which undergo elimination through the kidneys is usually measured by venous infusion of the tested substance and collection of the urine by means of urethral catheterization.

It seems possible, if the indicator substance is labelled with a γ -emitting isotope, to derive the data required for the calculation of the clearance rate taking counts over the bladder, thus avoiding the need of urethral catheterization and continuous infusion¹.

The purpose of this note is briefly to report the experiments which have been made in order to test such a possibility, the technique which has been developed, and the results obtained.

Method. The renal clearance of a substance circulating in the blood and eliminated, at least in part, by the kidneys is:

$$Cl = \frac{\Delta X_E}{\int_t^{t+\Delta t} x_p(t) dt} \quad (1)$$

where ΔX_E is the amount of the substance eliminated during the time interval Δt , and $x_p(t)$ the plasma concentration of the substance. When γ -emitting tracers are used, ΔX_E can be evaluated by external counting over the

¹ C. BIANCHI and P. TONI, *Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung*, Sonderbd. Strahlentherapie 53, 301 (1963).