

representative sections. Approximately 5000 cartilage nuclei were examined in each limb, and 1 to 5% of these nuclei contained 3 nucleoli. Comparable counts done on humeral cartilage of control triploid limbs gave percentages ranging from 19 to 23%. This comparison indicates that the grafted triploid cartilage contributed about 5 to 20% of the regenerated cartilage in the experimental limbs.

The 7 limbs in which the grafted triploid cartilage participated in regeneration were examined carefully to determine whether the graft gave rise to cell types other than chondrocytes. Adequate nucleolar number determinations could be made in two tissues – muscle and epidermis. In 5 of the 7 limbs the regenerated muscle contained no triploid nuclei, so far as could be determined. In the remaining two regenerates we found in the muscle a total of 4 scattered nuclei each with 3 nucleoli, out of a total of about 10,000 nuclei examined. Little significance can be attached to this observation, for reasons mentioned below.

Examination of the epidermis of the 7 regenerates showed the following. In 1 case the epidermis contained no nuclei with 3 or more nucleoli. In the remaining 6 cases we found widely scattered small groups of polyploid cells in the regenerated epidermis. However, in every case the maximum nucleolar number was 4 rather than 3, indicating that the cells were derived from host cells in which a doubling of chromosome number had occurred, rather than from the grafted triploid cells. The same ex-

planation could also be offered for the very rare trinucleolated muscle cells mentioned above, which could be tetraploid host cells in which a nucleolar fusion had occurred.

The results obtained in this study do not provide any evidence to indicate that cartilage cells change in type during limb regeneration. The possibility that cell type changes might occasionally occur is, of course, not excluded. However, our experiments indicate that if such changes take place they do so in a frequency so small that they cannot be detected by the nucleolar number marker⁶.

Résumé. Nous avons suivi de près, pendant la régénération, le comportement du cartilage triploïde greffé dans les membres diploïdes en nous servant du nombre nucléolaire comme marque cellulaire. La greffe de cartilage a fourni des cellules de cartilage au régénérat, mais elle n'a pas contribué à la découverte de cellules d'autres espèces.

J. PATRICK and R. BRIGGS

*Department of Zoology, Indiana University,
Bloomington (USA), January 23, 1964.*

⁶ This work was supported in part by a research grant from the Research Grants Division, U.S. Public Health Service (RG-5850).

Abschwächung der Toxizität von Nicotin durch Erhöhung der Thrombocytenzahl

Nicotin setzt bei intravenöser Injektion Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nebennierenmark frei; in früheren Arbeiten wurde von uns nachgewiesen, dass durch Nicotin nicht nur die Catecholamine, sondern auch die biogenen Amine 5-Hydroxytryptamin (Serotonin, 5-HT) und Histamin liberiert werden^{1,2}. Im Blut kreisende biogene Amine, insbesondere 5-HT, werden durch die Thrombocyten gespeichert und dadurch zeitweilig inaktiviert; die Blutplättchen können ein Vielfaches ihres ursprünglichen physiologischen Gehaltes an 5-HT aufnehmen³.

Wir prüften anhand der Toxizität des Nicotins, ob diese Fähigkeit einen Schutzmechanismus gegen die plötzliche Überflutung des Organismus mit pharmakologisch sehr wirksamen biogenen Aminen darstellt.

Methoden. Zu den Versuchen wurden 2,9–4,3 kg (Mittelwert 3,4 kg) schwere Kaninchen verwendet. In flacher Pernoctionnarkose wurde den Tieren je ein Polyäthylenkatheter in die A. carotis und in die V. jugularis gelegt. 7 Tieren wurde durch den Venenkatheter eine Thrombocytensuspension infundiert. Diese bestand aus unterschiedlichen Mengen von Thrombocyten, welche aus dem Blut von Spendertieren durch differenziertes Zentrifugieren² isoliert wurden. Die so gewonnenen Thrombocyten haben die Fähigkeit zur Aufnahme von Aminen nicht verloren². Sie wurden in physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von 1000 IE Heparin suspendiert und mit einigen ml aus der Carotis entnommenen Blutes des Versuchstieres vermischt. Allen anderen Versuchstieren wurde die gleiche Menge Kochsalz-Heparin-Blut-Mischung injiziert.

Die Bestimmung der Thrombocytenzahl erfolgte im arteriellen Blut nach der Infusion der Thrombocyten, bzw. der Kontrollsuspension. Die Zählung der Thrombocyten wurde nach der Methode von FEISLY-LÜDIN in der Modifikation von DERLATH⁴ durchgeführt. Unsere Versuchstiere wiesen im Durchschnitt einen Thrombocytennormalwert von 347 000/mm³ Blut auf. Durch die Infusion von aus 250 ml Blut gewonnenen Thrombocyten wurde z.B. die Thrombocytenzahl bei einem Versuchstier von 580 000/mm³ auf 1 380 000/mm³ erhöht. Nach der Infusion der Thrombocytensuspension wurde den Kaninchen 0,66 mg/kg Nicotin (freie Base in NaCl-Lösung) in die V. jugularis in Abständen von je 1 min bis zum Atemstillstand injiziert. Unmittelbar danach wurden die Tiere aus der A. carotis entblutet. Das Blut wurde durch differenziertes Zentrifugieren nach der Methode von LÖHR⁵ in Erythrocyten, Leukocyten, Thrombocyten und Plasma aufgeteilt. In den einzelnen Fraktionen wurde der Nicotiningehalt nach Isolierung des Alkaloids durch alkalische Wasserdampfdestillation mit einer Methode bestimmt, welche auf der Extinktionszunahme des Nicotins bei 259 m μ beim Wechsel vom neutralen zu saurem Milieu beruht⁶.

¹ H. SCHIEVELBEIN, E. WERLE und W. JACOBY, *Naturwiss.* 48, 602 (1961).

² H. SCHIEVELBEIN und E. WERLE, *Psychopharmacologia* 3, 35 (1962).

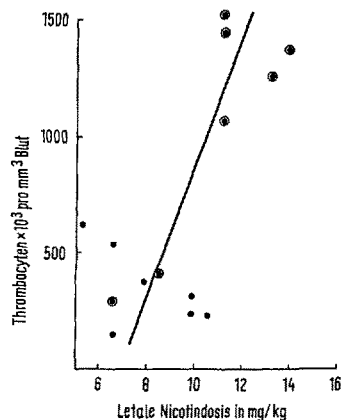
³ H. SCHIEVELBEIN, E. WERLE und INGRID ECKERT, *Arzneimittelforschung* 13, 211 (1963).

⁴ S. DERLATH, *Ärztl. Forschung* 1956, 552.

⁵ G. W. LÖHR und H. D. WALLER, *Klin. Wschr.* 37, 833 (1959).

⁶ Beiträge zur Tabakforschung Heft 8, 315 (1962).

Ergebnisse. In der Figur ist die letale Gesamtdosis von Nicotin in Beziehung gesetzt zur Zahl der Thrombocyten.



Beziehung zwischen der Thrombocytenzahl und der Toxizität von Nicotin bei Kaninchen. Korrelationskoeffizient $r=0,685$, Signifikanz $P=0,05$. ○ = Tiere, denen eine Thrombocyten suspension infundiert wurde. ● = Kontrolltiere.

Zwischen der tödlichen Gesamtdosis Nicotin und der Zahl der Thrombocyten im Blut besteht eine positive Korrelation.

Die Summe der in den einzelnen Fraktionen des Blutes, Erythrocyten, Leukocyten, Thrombocyten und Plasma nach dem Tod der Tiere gemessenen Nicotinmenge betrug nur rund 10% des infundierten Nicotins, wovon weniger als 1% auf die Thrombocyten entfielen.

Auf Grund unserer Versuche scheint es möglich, dass die akute Toxizität von Nicotin bei hohem Thrombocytengehalt des Blutes deshalb erniedrigt ist, weil die durch Nicotin freigesetzten biogenen Amine zum Teil in den Thrombocyten gespeichert werden können.

Summary. The toxicity of intravenously injected nicotine in rabbits is decreased when the number of thrombocytes in the blood is augmented by administration of platelet suspensions.

H. SCHIEVELBEIN und VERA SCHIRREN

Klinisch-Chemisches Institut der Chirurgischen Klinik der Universität München (Deutschland), 17. Februar 1964.

Esterase Alterations in Neurological Mutants of the Mouse¹

We have used vertical starch and agar gel electrophoresis for the preparation of zymograms for a variety of hydrolytic enzymes contained in mouse brains^{2,3}. The procedure of Smithies was used for both starch gel preparation and separation⁴; a gradient of 5 volts/cm was maintained for 16 h. For agar gel electrophoresis (1% Ionoagar-Difco dissolved in 0.05M barbital, pH 8.6) a voltage drop of 2.5–5 volts/cm was imposed for 3 h. Histochemical reactions were carried out by the azo-technique using β -naphthyl acetate, indoxyl acetate and indoxyl butyrate as substrates⁵; to distinguish cholinesterase activity gel strips were preincubated (30 min before addition of substrate) in 0.1 mM eserine sulfate. Brains were homogenized in barbital-veronal buffer (ionic strength 0.05, pH 8.5), centrifuged for 10 min at 200 g and aliquots of supernatant used for electrophoresis.

Differences were discernable in esterase patterns between all so-called neuromuscular mutants and their normal controls investigated. These differences were consistent despite the heterogeneity of some of the controls for the mutants, and always revealed themselves as deficiencies. The deletions of bands varied according to the neuromuscular disorder present and the substrate used; the following mutants were investigated^{2,3}: dilute lethal (gene symbol, d^1), ducky (du), jittery (ji), reeler (rl), spastic (spa), teetering (tn), and tottering (tg). We have previously reported that (cholin-) esterase in reeler may be present in a cryptic form and tightly bound to a particulate fraction that is electrophoretically immobile³.

Since deficiencies were observed independent of the mutant syndrome, it may be presumed that abnormalities in esterases could have basic importance in the genesis of neurologic disease, and that they are related to a defect in

the normal metabolism of myelin⁶. This may apply particularly to demyelinating disorders; whether or not all of the neurologic diseases studied are characterized by demyelination is not as yet established although in certain mutants, e.g. the dilute lethal, degenerating myelin is observed in the vestibulo-spinal, spino-cerebellar and tecto-spinal system appearing within a day or two after the first signs of myelination⁶. It is of interest that in multiple sclerosis of man, as well, losses or diminution of esterase bands occur in plaque tissues⁷. Because mutants at the dilute locus (alleles d and d^1) cause the carrier mice to be phenylketonuric, the neurologic abnormalities (seizures) were suggested to be related to an altered brain amine concentration resulting from decarboxylase inhibition by phenylalanine metabolites⁸. Comparison was made of amine levels (epinephrine, norepinephrine, serotonin), 5-hydroxytryptophan decarboxylase and monoamine oxidase, between normal (DD) and Dd^1 animals, as well as between males and females⁹; the heterozygotes (Dd^1) have roughly a 25–50% phenylalanine hydroxylase inhibition⁸. No differences were observed either between

¹ This investigation was supported by Public Health Service research Grant CA 04691-06 from the National Cancer Institute.

² E. M. JORDAN, Master's Degree Thesis, University of Maine (1963).

³ H. MEIER, E. M. JORDAN, and W. G. HOAG, J. Histochem. Cytochem. 10, 103 (1962).

⁴ O. SMITHIES, Biochem. J. 61, 629 (1955).

⁵ C. E. LUMSDEN, Quart. J. exp. Physiol. 37, 45 (1952).

⁶ D. E. KELTON and H. RAUCH, Exp. Neurol. 6, 252 (1962).

⁷ K. C. BARRON, J. BERNSHON, and A. R. HESS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 113, 521 (1963).

⁸ D. L. COLEMAN, Arch. Biochem. Biophys. 91, 300 (1960).

⁹ H. MEIER, 34th Annual Report, Roscoe B. Jackson Memorial Laboratory (1963), p. 86.