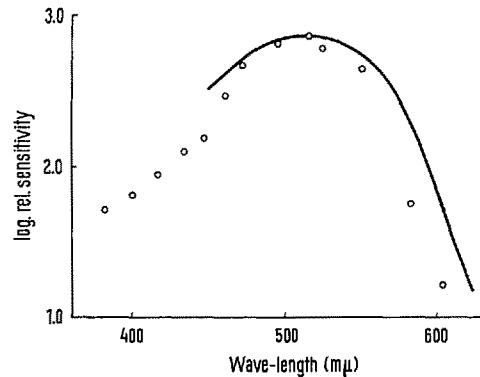


light absorbed by visual pigment depends on the optical density of the pigment³, the shape discrepancy between the sensitivity measurements and the absorption spectrum of lobster rhodopsin could be due to a low concentration of visual pigment in the unidentified photosensitive structure of *Niphargus*. An approximately equally high absolute light threshold (10 lm/m^2) and low sensitivity to red light has been reported in *Niphargus orcinus virei*⁴.



The circles show the relative spectral sensitivity of the negative photokinetic reaction of *Niphargus aquilex schellenbergi*. Equal quantum intensity spectrum 382–605 mμ. The absorption curve of lobster rhodopsin² is shown for comparison.

tration of visual pigment in the unidentified photosensitive structure of *Niphargus*. An approximately equally high absolute light threshold (10 lm/m^2) and low sensitivity to red light has been reported in *Niphargus orcinus virei*⁴.

Zusammenfassung. Die absolute Schwelle der negativen Phototaxis der augenlosen, unpigmentierten Antipode *Niphargus aquilex schellenbergi* Karaman liegt bei $3,5 \text{ lm/m}^2$, die Unterschiedsschwelle gegenüber höheren Leuchtdichten beträgt 17%. Die zwischen 382 und 605 mμ bestimmte Spektralsensitivität zeigt ein Maximum bei 515 mμ.

A. KURECK

William G. Kerckhoff-Herzforschungsinstitut der Max Planck Gesellschaft, Bad Nauheim (Deutschland), May 25, 1964.

⁴ R. GINET, Ann. Spéléol. 15, 127 (1960).

Aufnahme von Thymidin durch Mastocytomzellen *in vitro* unter der Einwirkung von Podophyllumstoffen

Die DNS-Synthese wird durch Cytostatica aus der Reihe der alkylierenden Stoffe (N-Lost, Äthylenimine) gehemmt^{1–3}; sie scheint jedoch durch Spindelgifte wie die Vincaalkaloide und Colchicin in therapeutischen Konzentrationen nicht beeinträchtigt zu werden^{4,5}.

Die Podophyllum-Wirkstoffe SP-G⁶ und SP-I⁷ stellen Cytostatica vom Spindelgifftyp dar⁸. Als spezifisch auf die Mitosespindel wirkende Präparate sollten sie den Einbau von Thymidin, welcher üblicherweise als Parameter der DNS-Synthese gilt und nicht während der Mitose stattfindet, nicht stören. Ob dies der Fall ist, wurde in den im folgenden dargestellten Versuchen abzuklären versucht.

In Erlenmeyerkolben sich vermehrenden P-815-Mastocytomzellen wurden SP-G, SP-I und zum Vergleich N-Lost (Methyldi(β-chloräthyl)-amin; Dichloren) in verschiedenen, die Zellvermehrung vollständig hemmenden Konzentrationen zugesetzt. Die Zellkulturen standen $2\frac{1}{2}$ bzw. $6\frac{1}{2}$ h unter der Einwirkung der Cytostatica. ³H-Thymidin wurde ihnen, sowie unbehandelten Kontrollkulturen, jeweils eine halbe Stunde vor Versuchsende in einer Konzentration von $0,08 \mu\text{g/ml}$ ($= 0,9 \mu\text{C/ml}$) zugegeben. Nach 30minütiger Inkubation mit Thymidin wurden die Kulturen in Eiswasser abgekühlt, die Zellen abzentrifugiert und in inaktiver Nährösung (Basalmedium Eagle mit 10% Pferdeserum und $0,004\%_{\text{so}}$ Folsäure) gewaschen. Hierauf erfolgte die Bestimmung der Radioaktivität im Sediment (dpm/mg Feuchtgewicht der Zellen). Aus diesen Zahlen lässt sich direkt auf den Thymidineinhalt der Zellen schliessen (siehe Tabelle).

Da sich bei SP-G und SP-I keine Abhängigkeit der Beeinflussung der DNS-Synthese von der Konzentration des

Wirkstoffes ergab, sind in der Tabelle die Resultate mit verschiedenen Konzentrationen zusammengefasst; die niedrigsten geprüften Gehalte sind so gewählt, dass sie eben noch eine totale oder subtotale Vermehrungshemmung zur Folge haben. Aus den Zahlen der Tabelle ist

Einfluss von 2 Podophyllumstoffen und einer alkylierenden Substanz auf den Thymidineinbau durch Mastocytomzellen *in vitro*. Konzentrationen: SP-G 0,63 bis $1,3 \mu\text{g/ml}$; SP-I 0,63 bis $3,2 \mu\text{g/ml}$; N-Lost (Dichloren) $0,1 \mu\text{g/ml}$. P = Signifikanz der Abweichungen von den Kontrollen.

Cytostaticum	Versuchsdauer h	Veränderung des Thymidineinbaus gegenüber Kontrollen %	P
SP-G	$2\frac{1}{2}$	– 1,7	$> 0,4$
SP-I	$2\frac{1}{2}$	+ 11,0	$> 0,1$
SP-I	$6\frac{1}{2}$	+ 3,0	$> 0,4$
N-Lost	$2\frac{1}{2}$	– 31,5	$< 0,01$
N-Lost	$6\frac{1}{2}$	– 35,0	$< 0,01$

¹ G. PALME, E. LISS und F. WIEBEL, Naturwissenschaften 51, 197 (1964).

² E. LISS und G. PALME, Naturwissenschaften 50, 672 (1963).

³ H. B. BREWER JR., J. P. COMSTOCK und L. ARONOW, Biochem. Pharmacol. 8, 281 (1961).

⁴ W. A. CREESEY und M. E. MARKIW, Biochem. Pharmacol. 13, 135 (1964).

⁵ TH. T. PUCK und J. STEFFEN, Biophysical J. 3, 379 (1963).

⁶ Benzylidenverbindungen der *Podophyllum-emodi*-Glucoside; Hauptkomponente ist Podophyllotoxin- β -D-bezylidenglucosid.

⁷ Äthylhydrazid der Podophyllinsäure.

⁸ H. STÄHELIN und A. CERLETTI, Schweiz. med. Wschr., im Druck.

ersichtlich, dass, im Gegensatz zu N-Lost, weder SP-G noch SP-I den Thymidineinbau hemmen. Bei SP-I ist sogar nach $2\frac{1}{2}$ h eine leichte, allerdings nicht signifikante Förderung erkennbar.

Von einem Teil der Kulturen wurden Ausstriche angefertigt und davon Autoradiogramme (Stripping-Film Kodak AR. 10) hergestellt. Die Auszählung der markierten Zellen und der Silberkörner nach Exposition ergab mit den Werten der Tabelle übereinstimmende Resultate.

Der Wirkungseintritt von SP-G und SP-I ist sehr rasch, schon 30–45 min nach Substanzzugabe sind keine späten Mitosephasen mehr auffindbar; in den hier erwähnten Versuchen wurde demnach der Thymidineinbau zu einem Zeitpunkt gemessen, da die volle Mitosehemmung längst eingetreten war. Da die Generationszeit der P-815-Zellen sehr kurz ist (unter günstigsten Bedingungen ca. 8 h⁹, üblicherweise 10–14 h), ist nach etwas mehr als 6 h rund die Hälfte der Zellen in Mitose eingetreten. Dass der Thymidineinbau nach 6stündiger Einwirkung von SP-I nicht gehemmt ist, deutet darauf hin, dass auch bei in Mitose arretierten Zellen die DNS-Synthese weitergehen kann. Morphologische Beobachtungen über die Entstehung von Polyploidie bei P-815-Mastocytomzellen nach Einwirkung von Podophyllumstoffen¹⁰ bestätigen diese Annahme. Es

kann somit geschlossen werden, dass die Podophyllum-Cytostatica SP-G und SP-I den während der Interphase (Ruhezellen) stattfindenden Thymidineinbau nicht beeinträchtigen, sondern ihre Wirkung auf den Zellteilungsprozess als solchen beschränken. Längere Versuchszeiten wurden nicht gewählt, da sich dann infolge Absterbens von Zellen usw. nicht genau kontrollierbare Sekundäreffekte einstellen.

Summary. SP-G and SP-I, two podophyllum preparations with spindle poison activity, were tested for their effect on ³H-thymidine incorporation into P-815 mastocytoma cells *in vitro*. Concentrations which inhibited cell multiplication completely did not affect DNA-synthesis as measured by thymidine incorporation.

K. BATZ, F. KALBERER und H. STÄHELIN

Medizinisch-biologische Forschung, Sandoz AG, Basel (Schweiz), 1. Juni 1964.

⁹ H. STÄHELIN, Med. exp. 7, 92 (1962).

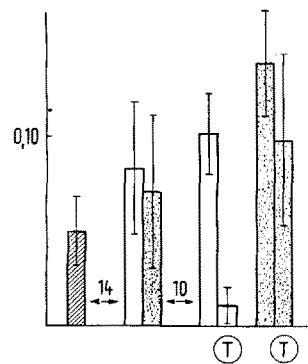
¹⁰ M. E. RÜSCH, unveröffentlichte Versuche.

The Effect of Thyroxine on the Formation of Oxidation Products of Lipids by Rat Liver Tissue under Different Nutritional Conditions

The antioxidant effect of thyroxine has been described by BUNYAN et al.¹ and KAUFMAN et al.². It seemed of interest to establish whether the effect of thyroxine on the rate of formation of lipid oxidation products can be modified by the nutritional state. This might be biologically important, as both the formation of peroxides and nutrition are considered to be amongst the factors which influence the ageing of the organism³.

Five-month-old rat males weighing 200–240 g were fed before the experiment on a diet of the following composition: 700 g bruised wheat, 100 g dry milk powder, 150 g casein, 30 g crushed alfalfa hay, 15 g CaCO₃, 50 g fat (100%), 7.5 g liver oil, 2.5 g NaCl and an amount of water sufficient to obtain a pasty consistence. Before the experimental period each rat was given 13 g of the dry diet of similar composition daily. Then the rats were divided into two groups. One group was fed *ad libitum* (they consumed, on an average, 10 g of the wet diet per 100 g body weight), the other group was fed 5 g of the wet diet per 100 g body weight. Fourteen days after the start of the controlled feeding, one part of the group of rats fed *ad libitum* and one part of those undernourished were injected subcutaneously daily for 10 days with 30 µg thyroxine per 100 g body weight injection solution Roche. The controls were injected with saline solution (0.03 ml per 100 g body weight) subcutaneously. The rats were given water *ad libitum*. Each subgroup included 6 rats. 24 h after the last injection the rats were killed by decapitation. The oxidation products of lipids were determined in the liver homogenates by means of 2-thiobarbituric acid (TBA) test, using a modified method of PLACER and SLABOCHOVÁ⁴. After the removal of the liver, 1 g of the tissue was cut into small pieces, which were

homogenized with 3 ml of ice-cold phosphate buffer pH 5.9 by means of a Potter-Elvehjem type homogenizer (15 strokes, rotation of the plunger 1500 revolutions per min) under simultaneous cooling. An aliquot (0.2 ml) of the homogenate was added to 5 ml of phosphate buffer, pH 5.9; immediately after, or after a 1 h incubation (37°C), the mixture was stirred and 2 ml of 10% trichloracetic acid were added; after 10 min the mixture was filtered,



Ordinate: extinctions. Hatched column: rats before the experiment. Solid columns: rats fed *ad libitum*. Open columns: undernourished rats. T: rats after the administration of thyroxine.

¹ J. BUNYAN, J. GREEN, E. E. EDWIN, and A. T. DIPLOCK, Biochim. biophys. Acta 47, 401 (1961).

² H. P. KAUFMANN, H. GARLOFF, and K. G. YEKUNDI, Fette, Seifen, Anstrichmittel 64, 688 (1962).

³ D. HARMAN, Rad. Res. 16, 753 (1962).

⁴ Z. PLACER and Z. SLABOCHOVÁ, Čs. fysiol. 9, 562 (1960).