

erhaltenen Werte betragen im Vergleich zur Wirksamkeit des Menschenharnes nur 20–35%. Andererseits bewirkt die Urokinase des Menschen eine Aktivierung des Meerschweinchenprofibrinolytins in signifikanter und gut reproduzierbarer Weise.

Bei Verwendung von Serum anstelle von Plasma ergeben sich prinzipiell die gleichen Befunde. Die auftretenden Aktivitäten sind jedoch weitaus geringer. Dies weist darauf hin, dass der grösste Teil des Plasmaprofibrinolytins bei der Gerinnung an Fibrin angelagert wird.

Eine Anreicherung der Meerschweinchenurokinase kann durch Fällung des Harnes mit gleichem Volumen Aceton erfolgen. Die Fällung wird bei  $-10^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Nach Zentrifugierung wird die Fällung in Phosphatpuffer pH 7,4 aufgelöst, wobei nur ein Zehntel des ursprünglichen Harnvolumens verwendet wird. Diese

Lösung, die nun gegen Leitungswasser dialysiert wird, enthält eine zehnmal höhere Urokinaseaktivität als der Ausgangsharn.

**Summary.** In contrast to the urinary fibrinolysokinase (= urokinase) of other species, the urokinase in guinea-pigs reveals a most peculiar behaviour. A significant and well reproducible activation of fibrinolysin is obtainable only when guinea-pig fibrinolysin is used. Fibrinolysin of other species is only slightly activated. This fact is most important in investigations on the increased fibrinolytic activity of guinea-pig urine.

W. RAAB

Medizinisch-chemisches Universitäts-Institut, Wien (Österreich), 19. Mai 1964.

### Ribonucleaseaktivität isolierter Nebennierenmarkgranula

Die chromaffinen Granula der Nebennierenmarkzellen vom Rind enthalten neben Brenzcatechinaminen, ATP und Eiweiss auch Ribonucleinsäure (RNS) (HILLARP<sup>1</sup>, PHILIPPU und SCHÜMANN<sup>2</sup>). In Inkubationsversuchen mit isolierten Nebennierenmarkgranula konnten wir zeigen, dass die bei  $37^{\circ}\text{C}$  auftretende spontane Freisetzung von Brenzcatechinaminen und ATP von einer RNS-Freisetzung begleitet ist und ferner, dass die Zugabe von kristalliner Ribonuclease (RN-ase) durch Depolymerisierung der granulären RNS zu einer dosisabhängigen und prozentual gleich starken RNS-, Amin- und ATP-Freisetzung führt (PHILIPPU und SCHÜMANN<sup>2,3</sup>). Wie die zugesetzte RN-ase eine Verminderung des RNS-, Brenzcatechinamin- und ATP-Gehaltes verursacht, so könnte auch die spontane Freisetzung dieser Substanzen bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf der depolymerisierenden Wirkung einer granulären RN-ase beruhen. Wir haben deshalb untersucht, ob die durch Zentrifugieren über einem Dichtegradienten von Mitochondrien und anderen cytoplasmatischen Partikeln abgetrennten chromaffinen Granula eine RN-ase-Aktivität besitzen. Gleichzeitig wurde der RNS-, Eiweiss- und Brenzcatechinamingehalt bestimmt.

**Methoden.** Die Granula wurden nach der von SCHÜMANN und WEIGMANN<sup>4</sup> angegebenen Methode durch Differentialzentrifugieren ( $0^{\circ}\text{C}$ , Spinco Ultrazentrifuge) aus Nebennierenmarkhomogenaten vom Rind gewonnen und in  $0,3\text{ M}$  Saccharoselösung suspendiert, so dass 1 ml der Suspension Granula aus 200 mg Markgewebe enthielt. Diese Suspension enthält neben chromaffinen Granula auch Mitochondrien und andere cytoplasmatische Partikel. Zur Gewinnung reiner chromaffiner Granula wurde die Suspension nach dem Verfahren von HAGEN und BARNETT<sup>5</sup> über einem Dichtegradienten (Figur 1) nochmals zentrifugiert (60 min, 100 000 g, Rotor SW 39). Es wurden ein partikelfreier Überstand (Fraktion 1) und 4 partikelhaltige Fraktionen erhalten. Die Fraktionen 2–4 wurden mit der doppelten Menge  $0,3\text{ M}$  Saccharoselösung verdünnt, 60 min lang bei 100 000 g abzentrifugiert, die niedergeschlagenen Partikel der Fraktionen 2–4 und das Sediment (Fraktion 5) mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen, erneut zentrifugiert und die Sedimente bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Für jeden Versuch wurden die einzel-

nen Fraktionen aus 18 Röhrchen verwendet. Für die Bestimmungen wurden die Rückstände der Fraktionen 2–5 in 4 ml Aqua dest. aufgenommen, die Fraktion 1 (Überstand) unverdünnt verwendet. In einem aliquoten Teil (0,1–0,2 ml) der einzelnen Fraktionen wurde die RN-ase-Aktivität nach der Methode von DE DUVE, PRESSMAN, GIANETTO, WATTIAUX und APPELMANS<sup>6</sup> bei pH 5,0 bestimmt, nachdem sich in Vorversuchen ergeben hatte, dass die RN-ase-Aktivität der Fraktionen bei pH 8,0 nur 15–20% der Aktivität bei pH 5,0 betrug. Ein anderer Teil (2 ml) wurde mit 10%iger Trichloressigsäurelösung extrahiert; im Überstand wurden die Brenzcatechinamine nach v. EULER und HAMBERG<sup>7</sup>, im Rückstand das Eiweiss

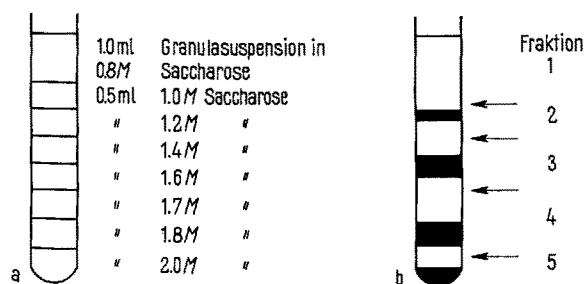


Fig. 1. Trennung der chromaffinen Granula von anderen cytoplasmatischen Partikeln. a, Herstellung des Dichtegradienten; b, Verteilung der Zellpartikel nach dem Zentrifugieren. Die Pfeile weisen auf die Stellen hin, an denen die Röhrchen zur Gewinnung der Fraktionen durchgeschnitten wurden.

<sup>1</sup> N. A. HILLARP, *Acta physiol. scand.* **43**, 292 (1958).

<sup>2</sup> A. PHILIPPU und H. J. SCHÜMANN, *Nature* **198**, 795 (1963).

<sup>3</sup> A. PHILIPPU und H. J. SCHÜMANN, *Exper.* **19**, 17 (1963).

<sup>4</sup> H. J. SCHÜMANN und E. WEIGMANN, *Arch. exp. Path. Pharmac.* **240**, 275 (1960).

<sup>5</sup> P. HAGEN und R. J. BARNETT, *Adrenergic Mechanisms* (I. & A. Churchill Ltd., London 1960), p. 83.

<sup>6</sup> C. DE DUVE, B. C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX und F. APPELMANS, *Biochem. J.* **60**, 604 (1955).

<sup>7</sup> U. S. v. EULER und U. HAMBERG, *Acta physiol. scand.* **19**, 74 (1949).

nach GORNALL, BARDAWILL und DAVID<sup>8</sup> und die RNS nach WEBB<sup>9</sup> bestimmt.

**Ergebnisse.** Die prozentuale Verteilung der Brenzcatechinamine, der RNS und der RN-ase-Aktivität wurde pro mg Eiweiss berechnet und in der Figur 2 dargestellt. Die Fraktion 1 ist nach den biochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen von HAGEN und BARNETT<sup>5</sup> partikelfrei; das Vorkommen von Brenzcatechinaminen, RNS, Eiweiss und RN-ase-Aktivität in dieser Fraktion ist wahrscheinlich auf die während des Trennungsverfahrens aus geschädigten Partikeln frei-

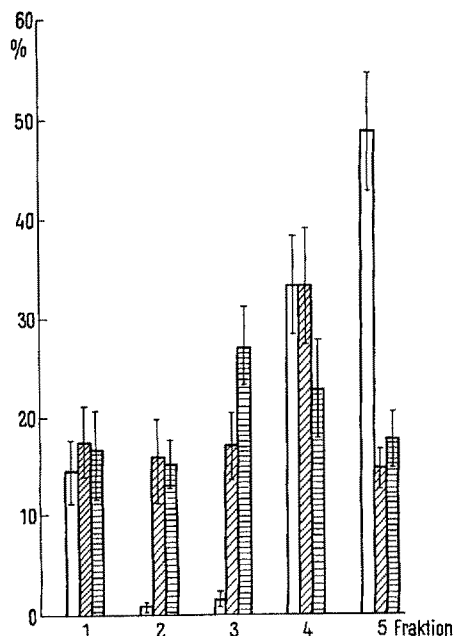


Fig. 2. Prozentuale Verteilung von Brenzcatechinaminen, RNS und RN-ase-Aktivität (pH 5,0) pro mg Eiweiss in den einzelnen Fraktionen. □ Amin, ▨ RNS, ▩ RN-ase-Aktivität. Mittelwerte von 4 Versuchen und deren Standardabweichungen.

werdenden Substanzen zurückzuführen. Die Fraktion 2 besteht aus Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum, die Fraktion 3 aus Mitochondrien. Beide enthalten fast keine Brenzcatechinamine, wohl aber RNS (16,3% bzw. 17,3%) und RN-ase-Aktivität (15,3% bzw. 27,1%). Die Fraktion 4 enthält einen grossen Anteil an Brenzcatechinaminen (33,5%), 33,6% des RNS-Gehaltes und 23,0% der RN-ase-Aktivität, da sie in der Hauptsache chromaffine Granula enthält und ausserdem 10–15% der Mitochondrien. Die Fraktion 5 besteht nur aus chromaffinen Granula und enthält mit 49,8% die meisten Brenzcatechinamine, fast soviel RNS wie die Mitochondrienfraktion 3 (15,7%) sowie 18,7% der gesamten RN-ase-Aktivität.

Die chromaffinen Granula des Nebennierenmarks enthalten demnach eine erhebliche RN-ase-Aktivität, die für die bei 37°C spontan auftretende RNS-, Brenzcatechinamin- und ATP-Freisetzung verantwortlich sein könnte.

**Summary.** Homogenates from suprarenal medulla of cattle were fractionated by density gradient centrifugation. The catecholamine and RNA content of all fractions obtained, as well as their RN-ase activity, were determined and expressed as % per mg protein. The chromaffin granules contain 49.8% of the catecholamines, 15.7% of the RNA, and 18.7% of the RN-ase activity of all fractions. The demonstration of RN-ase activity in the chromaffin granules is in favour of the hypothesis that this enzyme could catalyse the spontaneous release of RNA, catecholamines, and ATP at 37°C.

A. PHILIPPU und H. J. SCHÜMANN<sup>10</sup>

Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt am Main (Deutschland), 11. Juni 1964.

<sup>8</sup> A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL und M. M. DAVID, J. biol. Chem. 177, 751 (1949).

<sup>9</sup> J. M. WEBB, J. biol. Chem. 221, 635 (1956).

<sup>10</sup> Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

### Effect of Carbon Tetrachloride Intoxication on the Liver of Toad (*Bufo melanostictus*)

Fatty infiltration with degenerative changes in liver has been observed after carbon tetrachloride intoxication in rats<sup>1</sup>, rabbits<sup>2</sup>, guinea-pigs<sup>3</sup> and mice<sup>4</sup>. OPPENHEIMER<sup>5</sup> observed that the intoxication produced hepatic damage in some of the hens but not in roosters. To our knowledge the effect of this hepatotoxic agent has not been studied in lower vertebrates. In the present investigation, the effect of carbon tetrachloride administration on the liver of toad (*Bufo melanostictus*) has been described.

50 toads were used in the experiment. They were collected from natural environment during non-hibernating (May–June) and hibernating (Jan.–Feb.) seasons and kept for 2 days in the laboratory prior to experiment. The

animals were given a single intraperitoneal injection of carbon tetrachloride in coconut oil; the maximum dose was 0.6 ml/100 g and the minimum 0.03 ml/100 g. Control animals were injected with coconut oil only. Some of the toads were injected with adrenaline-ephedrine solution at a dose level of 5 µ/100 g body weight 1 h after carbon tetrachloride administration and were killed after 24 h. The livers of all the animals were fixed in formol. Sections

<sup>1</sup> C. BAISCH und K. SCHREIER, Nuclear Med. 1, 182 (1959).

<sup>2</sup> G. T. PAVLOV, Arkh. Patol. 13, 39 (1951).

<sup>3</sup> V. CALI, Bull. Soc. ital. Biol. sper. 31, 948 (1955).

<sup>4</sup> H. BORNIG, K. STADE, H. FRUNDER, and G. RICHTER, Z. physiol. Chem. 310, 232 (1958).

<sup>5</sup> E. H. OPPENHEIMER, Bull. Johns Hopkins Hosp. 102, 313 (1958).