

Finally, the effect of adrenalin and noradrenalin was examined. Both hormones increased lipolytic activity of white adipose tissue at all ages but were without effect in brown tissue (Table II).

The results presented here show that the greater utilization of fat in the suckling period is not related to greater breakdown of triglycerides in adipose tissue, but that, on the contrary, exogenous fat seems to be the main source of energy and of fat laid down in the body. They also show that, as far as hormone sensitive lipase is concerned, differences between white and brown adipose tissue are apparent only in adult animals and that adrenalin and

noradrenalin are without effect in the latter, which is surprising in view of the finding that brown adipose tissue in new-born animals has been reported to be very responsive to noradrenalin and to be the main 'stove' of the body (DAWKINS<sup>5</sup>). Nevertheless, there are some indications that in new-born rats brown adipose tissue is of special significance. First, it is the only adipose tissue present, and, secondly, lipase activity, if calculated per unit body weight, is greater on day 1 than on day 10, since brown adipose tissue hardly grows after birth. Thirdly, corticosterone is more effective in brown than white immature tissue.

The ubiquitous effect of corticosterone on enzyme activity has again been demonstrated (see HAHN et al<sup>4</sup>). It may be suspected that there is some common factor that starts off the many changes described after steroid administration to infant mammals, though its nature is still a mystery.

**Zusammenfassung.** Die Aktivität hormonsensitiver Lipasen im weissen und braunen Fettgewebe der Ratte steigt zwischen dem 10. und 18. Tag nach der Geburt. Corticosteronzufuhr verursacht bei 10tägigen Ratten einen Aktivitätsanstieg. Adrenalin und Noradrenalin haben im braunen Fettgewebe keinen Effekt.

P. HAHN

*Institute of Physiology, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (Czechoslovakia), April 20, 1965.*

Age in days	Treatment	Lipase activity in % of non-treated tissue	
		white	brown
10	corticosterone	155 <sup>a</sup>	360 <sup>a</sup>
10	saline	100	100
10	noradrenalin <sup>b</sup>	144 <sup>a</sup>	136
10	adrenalin	266 <sup>a</sup>	90
21	noradrenalin	366 <sup>a</sup>	100
21	adrenalin	250 <sup>b</sup>	100

<sup>a</sup> Significant difference against control value of same age ( $p < 0.01$  to 0.02). <sup>b</sup> Adipose tissue was incubated for 110 min in Krebs Ringer bicarbonate solution with 3% albumin and a further 10 min with 10  $\mu$  adrenalin or noradrenalin (see <sup>3</sup>). Lipase activity was then determined as described in the text. 6 to 10 animals in each group.

<sup>5</sup> M. J. R. DAWKINS, J. Physiol. 172, 216 (1964).

## Über DPNH-Diaphorase und alkalische Phosphatase bei Präimplantationsstadien des Goldhamsters (*Mesocricetus auratus* Waterh.)

Über die Aktivität von verschiedenen Fermenten bei frühen Furchungsstadien von Nichtsäugern, insbesondere von Seeigeln, liegen mehrere Arbeiten vor<sup>1</sup>. Dagegen finden sich in der Literatur nur wenige Arbeiten über die histochemisch nachweisbaren Fermentaktivitäten bei Präimplantationsstadien von Säugern<sup>2-4</sup>. Wir haben uns daher die Aufgabe gestellt, die Befruchtungs- und Segmentationsstadien bei kleinen Säugern histochemisch zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die ersten Ergebnisse an den Eiern des Goldhamsters (*Mesocricetus auratus* Waterh.).

**Material und Technik.** Histochemisch haben wir die Aktivität der DPNH-Diaphorase an 20 Eiern und diejenige der alkalischen Phosphatase an 5 Eiern von insgesamt sechs Goldhamstern untersucht. Nach der Gewinnung der Eier durch Tubenspülung mit Tyrodescher Lösung wurden diese mit einer Pipette in einen speziell konstruierten Färberichter<sup>5</sup> gebracht, in welchem die Reaktion ohne Vorfixierung durchgeführt wurde. Für den Nachweis der DPNH-Diaphorase verwendeten wir als Diazosalz das MTT, für denjenigen der alkalischen Phosphatase das Echtblausalz BB. Nach Beendigung der

Reaktion wurden die Eier mit Formol-Dextran fixiert und auf einen Objektträger übertragen, auf welchem sie mit Glycerin-Gelatine eingeschlossen wurden. Anschliessend wurde der Gehalt der Eier an Reaktionsprodukten unter Verwendung geeigneter Interferenzfilter histophotometrisch untersucht. In jeder Eizelle, respektive Blastomere wurden an 5 bis 9 Stellen die Absorptionswerte bestimmt.

**Ergebnisse.** (a) DPNH-Diaphorase: In allen 7 untersuchten befruchteten 1-Zellstadien fällt die Reaktion deutlich positiv aus. Der durchschnittliche Absorptionswert ist bedeutend höher als bei den untersuchten 2- und 4-Zellstadien. Wir haben bei sämtlichen Eizellen eine auffallend polare Verteilung des Reaktionsproduktes im

<sup>1</sup> T. GUSTAFSON und I. HASSELBERG, Exp. Cell Res. 1, 371 (1950). – T. GUSTAFSON, Int. Rev. Cytol. 3, 277 (1954). – F. CARRANO und F. PALAZZO, Riv. Biol. 47, 193 (1955). – S. BÄCKSTRÖM, Exp. Cell Res. 18, 347 (1959). – S. C. HSIAO und W. K. FUJII, Exp. Cell Res. 32, 217 (1963).

<sup>2</sup> J. MULNARD, C. r. Soc. Biol. 147, 1477 (1953).

<sup>3</sup> A. DALCQ, C. r. Acad. Sci. Paris 249, 2851 (1959). – A. DALCQ, Arch. Biol. 73, 405 (1962).

<sup>4</sup> C. H. LIN, CH. F. HUANG und T. K. CHANG, Acta biol. exp. sinica 9, 281 (1964).

<sup>5</sup> P. ELMIGER, Exper. 21, 670 (1965).

Cytoplasma festgestellt (Figur 1), wobei die maximalen Absorptionswerte bei einigen Eizellen annähernd doppelt so hoch sind wie die minimalen. Die Messwerte im Zentrum der Zellen liegen im allgemeinen unter den gemessenen Minimalwerten in der Zellperipherie.

Im 2-Zellstadium sind jeweils beide Blastomeren der 11 untersuchten Eier deutlich positiv (Figur 2, 3). Der durchschnittliche Absorptionswert der einzelnen Blastomere ist geringer als bei den befruchteten 1-Zellstadien. Die durchschnittlichen Absorptionswerte der beiden Geschwisterblastomeren sind bei fünf Eiern genau gleich gross, bei drei anderen dagegen auffallend stark verschieden; bei den übrigen drei Eiern weisen sie nur kleine Differenzen auf. In den einzelnen Blastomeren ist eine polare Verteilung der Reaktionsprodukte zu beobachten, die stärker ausgeprägt ist als im 1-Zellstadium (Figur 2).

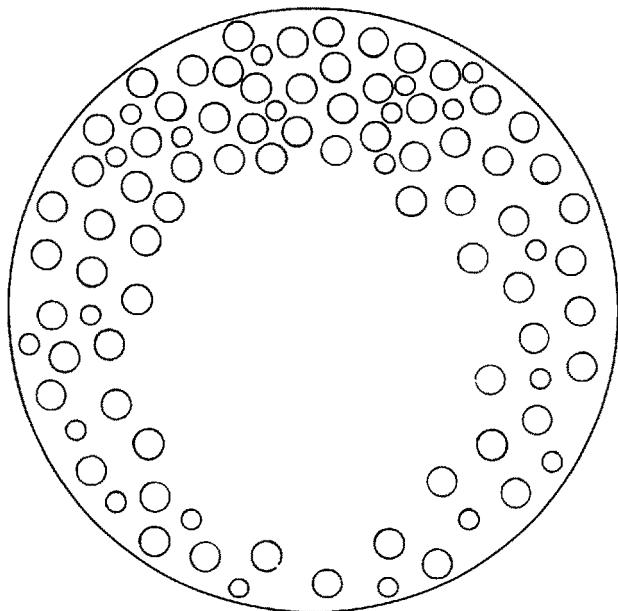


Fig. 1. Befruchtete Eizelle des Goldhamsters. Schema der polaren Verteilung des Reaktionsproduktes beim DPNH-Diaphorasesnachweis mit MTT.

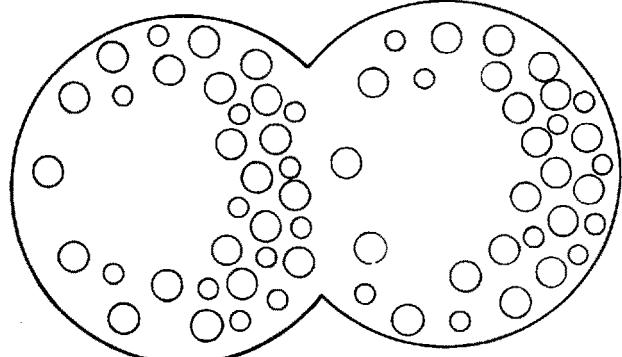


Fig. 2. 2-Zellstadium des Goldhamsters. Das Schema zeigt die polare Verteilung des Reaktionsproduktes beim DPNH-Diaphorasesnachweis in jeder der beiden Blastomeren. Die Stellen mit maximaler und minimaler Einlagerung des Reaktionsproduktes in den einzelnen Blastomeren sind bei den untersuchten 2-Zellstadien nicht gesetzmässig lokalisiert.

Die Verteilung der Reaktionsprodukte in der einen Blastomere ist aber nicht spiegelbildlich symmetrisch zu derjenigen in der dazugehörigen zweiten Blastomere (vgl. Figur 2 und 3). Der Messwert im Zentrum liegt nicht unter dem Minimalwert in der Peripherie.

Alle vier Blastomeren beider untersuchten 4-Zellstadien reagieren deutlich positiv. Der durchschnittliche Absorptionswert der einzelnen Blastomeren liegt in der gleichen Grössenordnung wie bei den 2-Zellstadien. Die durchschnittlichen Absorptionswerte der vier Blastomeren eines Eies weisen nur kleine Unterschiede auf. In den einzelnen Blastomeren ist eine Polarität zu beobachten. Sie ist jedoch weniger ausgeprägt als beim 2-Zellstadium und auch etwas geringer als beim 1-Zellstadium.

(b) Alkalische Phosphatase: Das unbefruchtete und die beiden befruchteten Eier im 1-Zellstadium sowie das untersuchte 2- und 3-Zellstadium zeigen im Cytoplasma eine deutlich positive Reaktion (Figur 4). Die durchschnittlichen Absorptionswerte der einzelnen Blastomeren sind gleich gross. Eine polare Verteilung der Reaktionsprodukte ist in allen untersuchten Stadien vorhanden, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei der DPNH-Diaphorasereaktion. Im Zentrum der Zellen finden sich hohe Messwerte.

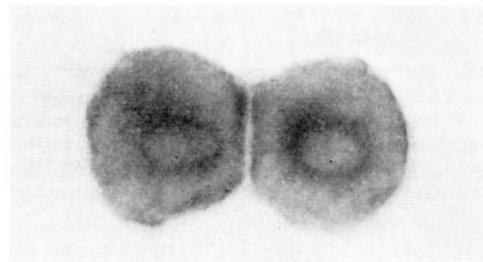


Fig. 3. 2-Zellstadium des Goldhamsters (H 62/9). In der linken Blastomere Anhäufung des Reaktionsproduktes oben links, in der rechten Blastomere weniger deutlich in der oberen Zellhälfte. In beiden Blastomeren sind die Kerne von einem unterschiedlich dicken Mantel von Reaktionsprodukten umgeben.  $\times 510$ . DPNH-Diaphorasesnachweis mit MTT.

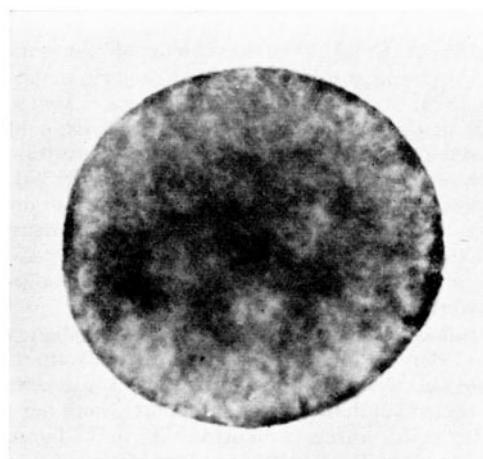


Fig. 4. Befruchtete Eizelle des Goldhamsters (H 55/1). Es ist eine mässige polare Verteilung des Reaktionsproduktes zu erkennen: das Cytoplasma erscheint im unteren Drittel etwas heller als in der übrigen Zelle.  $\times 510$ . Alkalischer Phosphatasenachweis mit Echtblau-salz BB.

Für genauere quantitative Angaben ist unser Material noch zu klein. Diesbezügliche Untersuchungen sind im Gange.

*Diskussion.* Entgegen den Angaben von MULNARD<sup>2</sup> haben wir schon während der ersten Segmentationsteilungen in den Blastomeren eine deutlich positive Reaktion auf alkalische Phosphatase gefunden. Eine bilateral symmetrische Verteilung der Reaktionsprodukte in den beiden Blastomeren des 2-Zellstadiums konnten wir weder bei der Reaktion auf DPNH-Diaphorase noch bei derjenigen auf alkalische Phosphatase feststellen. Dies steht im Gegensatz zu den Angaben von DALCQ<sup>3</sup>, der eine bilateral symmetrische Verteilung der ATPase in bezug auf die erste Teilungsebene gefunden hat. Ob die polare Verteilung der Reaktionsprodukte in den einzelnen Blastomeren mit den Angaben über die Verteilung mehrerer Dehydrogenasen<sup>4</sup> übereinstimmt, müssen weitere Untersuchungen abklären<sup>6</sup>.

*Summary.* The activity of the DPNH-diaphorase and the alkaline phosphatase were examined in golden-hamster eggs prior to fixation. The reactions for DPNH-diaphorase as well as for alkaline phosphatase were found to be positive already in the undivided egg and in early cleavage stages. The reaction products of both enzyme determinations showed a histophotometrically measurable polar distribution in the cytoplasm, in the one-cell stage as well as in the individual blastomeres of the examined early cleavage stages.

P. ELMIGER und K. S. LUDWIG

Anatomisches Institut der Universität Basel (Schweiz),  
3. September 1965.

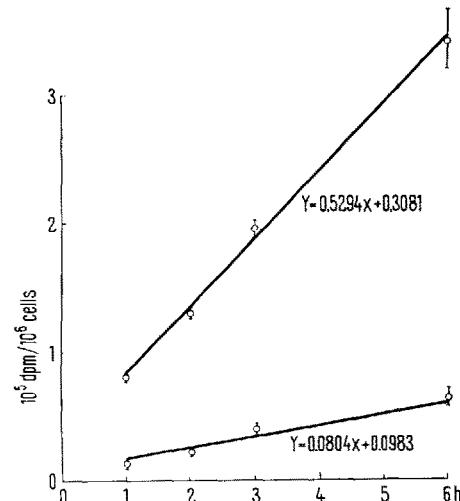
<sup>6</sup> Diese Untersuchungen wurden durch einen Beitrag der Ford Foundation ermöglicht.

### Growth of Chick Aortic Endothelial Cells: Incorporation of Tritiated Uridine and Thymidine<sup>1</sup>

Aortic cell culture systems have been utilized to study certain aspects of atherosclerosis at the cellular level<sup>2-4</sup>. However, these studies have been principally histochemical. We have attempted to measure cell metabolic rate more quantitatively with radioisotopes added to a small amount of cells in culture. Our experiments have determined cell growth in chick aortic endothelial cell cultures using  $H^3$ -uridine and  $H^3$ -thymidine. Subcultures of primary lines produced cells characterized by a pronounced acceleration of incorporation of the  $H^3$ -pyrimidines and a marked increase in size.

Single intimal cells were obtained by trypsinizing the aortic intimal layers of 3-week-old Rhode Island Red chicks. The cells were resuspended 1:225 (v/v) in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM)<sup>5</sup> with 10% fetal calf serum, and planted 5 ml/30 ml tissue culture flask. For secondary and succeeding cell cultures, the cells were transferred by trypsinization after approximately 1 week. Following exposure to 0.2  $\mu$ C/ml  $H^3$ -uridine or  $H^3$ -thymidine<sup>6</sup> in MEM with 5% calf serum at 37°C, the sheets of aortic cells were washed 3 times with GKN solution<sup>5</sup> and trypsinized, and cell counts were made. Cells were then dissolved by hyamine to determine the radioactivity by liquid scintillation spectrometer. Autoradiographic studies were also made of the same cell cultures.

The mean  $H^3$ -uridine determinations from 6 separate experiments are presented in the Figure. The regression equations<sup>7</sup> of 1-day-old cultures calculated from the experimental values are: primary cultures,  $Y = 0.0804x + 0.0983$ , and secondary cultures,  $Y = 0.5294x + 0.3081$ . Highly significant regression lines in both cultures indicate the experiments are reproducible ( $P < 0.001$ ). The calculation also shows there is no deviation from linearity in either regression ( $0.2 > P > 0.05$ ), indicating that the incorporation rate is constant within the 6 h period. The  $H^3$ -thymidine uptake rate was essentially the same. The effect of culture age on  $H^3$ -uridine incorporation into first and second generation aortic cells, treated identically, was



$H^3$ -uridine incorporation into primary and secondary chick aortic endothelial cells. Points and vertical lines represent means and standard errors.

<sup>1</sup> Supported by NIH grants HE-05998, and Research Career Award AI-K6-20-517 to Dr. J. J. QUILLIGAN JR.; Atomic Energy Commission contract AT(04-3)-322; and grants from the John A. Hartford Foundation and the Crenshaw Research Foundation.

<sup>2</sup> A. W. BRANWOOD, *Pathogenesis of Coronary Atherosclerosis* (E. & S. Livingstone, Edinburgh and London 1963), p. 74.

<sup>3</sup> L. M. MORRISON, O. A. SCHIEIDE, J. J. QUILLIGAN JR., L. FREEMAN, and R. HOLMAN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 113, 362 (1963).

<sup>4</sup> O. J. POLLAK and T. KASAI, Am. J. med. Sci. 248, 105 (1964).

<sup>5</sup> D. J. MERCHANT, R. M. KAHN, and W. H. MURPHY, *Handbook of Cell and Organ Cultures* (Burgess Publishers, Minneapolis 1960), p. 174.

<sup>6</sup> Specific activity of  $H^3$ -uridine is 3.1 C/mM and that of  $H^3$ -thymidine is 3.5 C/mM. Purchased from Volk Radiochem. Co.

<sup>7</sup> G. W. SNEDECOR, *Statistical Methods* (Iowa State College Press, 1950), p. 103, 340.