

of the activity of the controls. On the contrary, 0.1–0.05 mM concentrations of 1,10-phenanthroline inhibit almost completely the proline hydroxylation, but here the activity of collagenous proline- C^{14} is the same as in control collagen. This means that α, α' -dipyridyl blocks the formation of collagen hydroxyproline without influencing the sum of total imino acids in collagen. By the effect of 1,10-phenanthroline hydroxyproline-deficient collagen is formed, containing approximately half the amount of imino acids compared with normal collagen. Therefore, it can be presumed that the first substance inhibits the hydroxylation of proline at the final collagenous polypeptide stage, whereas 1,10-phenanthroline prevents either only the incorporation of proline to be hydroxylated or proportionally decreases the incorporation of all amino acids into the collagenous molecule so that both normal proline and proline to be hydroxylated participate even in this case in the resulting activity of proline. This latter hypothesis proved to be correct⁴. It is worth mentioning that the same results with both substances studied were achieved for the couple lysine/hydroxylysine by HURYCH and NORDWIG⁵. The interference of both chelates under investigation in proline hydroxylation is in favour of Fe^{2+} (or possibly Cu^{2+}) containing enzyme responsible for this reaction, since only Fe^{2+} , Cu^{+} or Cr^{3+} stimulated proline hydroxylation in vitro⁶.

Zusammenfassung. Während der Inkubation von Hautschnitten der Hühnerembryonen mit C^{14} -Prolin entstehen bei Anwesenheit von 0,1–1 mM Dipyridyl und 0,05–1 mM 1,10-Phenanthrolin anomale Kollagene, die kein Hydroxyprolin enthalten. Mit Dipyridyl wird die normale Menge, mit Phenanthrolin nur die Hälfte der Iminosäuren eingebaut. Beide Stoffe beeinflussen in den angeführten Konzentrationen die Biosynthese (Inkorporation von C^{14} -Prolin) in nicht-kollagene Eiweißstoffe nicht.

M. CHVAPIL, E. EHRLICHOVÁ,
and J. HURYCH

Department of Experimental Biology, Institute of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, Prague (Czechoslovakia), January 25, 1965.

⁴ M. CHVAPIL, J. HURYCH, E. EHRLICHOVÁ and B. ČMUCHALOVÁ, *Biochim. biophys. Acta*, in press.

⁵ J. HURYCH and A. NORDWIG, personal communication to be published in *Biochim. biophys. Acta*.

⁶ M. CHVAPIL and J. HURYCH, *Nature* **184**, 1145 (1959).

Ultrastruttura della calcificazione distrofica renale da sublimato

Nel quadro delle ricerche che si vanno da tempo compiendo nel nostro Istituto sul fenomeno della calcificazione animale, uno di noi ha in precedenti lavori (PALLADINI et al.^{1,2}) sottolineato il valore che hanno i dati deducibili dallo studio delle calcificazioni tessutali anormali ai fini della precisazione del ruolo svolto nel fenomeno fisiologico di precipitazione calcarea dalle varie sostanze e strutture che si riscontrano nel focolaio calcifico. In questo campo di ricerca si inquadrano i precedenti lavori (PALLADINI³; PALLADINI et al.⁴) sulla istochimica della calcificazione distrofica da sublimato nel rene; riportiamo in questa nota i dati ricavati dallo studio ultrastrutturale di questo tipo di calcificazione rivolto ad indagare il valore di elementi submicroscopici nella genesi del fenomeno indicato.

Frammenti di rene provenienti da ratti Wistar adulti trattati con 0.5 mg/100 g peso di $HgCl_2$ e sacrificati dopo 72 h sono stati fissati in gluteraldeide 3% in tampone fosfato pH 8.0; alcuni di essi sono stati rifissati in Osmio 2% in tampone veronal-acetato pH 7.4–7.6 con $CaCl_2$ 0.005 M. Opportune colorazioni di controllo (alizarina, v. Kossa) hanno dimostrato l'assenza di fenomeni di decalcificazione in seguito alle tecniche usate. Inclusione in vestopal W (KURTZ⁵), colorazione al Pb (KARNOVSKY⁶). Osservazione al M.E. HITACHI IIC 11. L'osservazione è stata particolarmente diretta sui tubuli completamente necrotizzati, riconoscibili per la spessa membrana basale che li circonda, mentre tutto lo spazio una volta occupato dalle pareti tubulari appare riempito da detriti cellulari di varia opacità; tra questi detriti appaiono caratteristicamente due tipi di elementi: (a) numerosissimi mitocondri, rigonfi e tondeggianti, di varia opacità, in cui è

ancora ben riconoscibile la doppia membrana e alcune cristae mentre la matrice è occupata da masse opache, flocculente (Figura 1) e da caratteristici agglomerati di piccole particelle intensamente osmiofile disposte ad anello, già osservate da MOLBERT et al.⁷, in stretta relazione con le membrane delle cristae, ma non comprese tra le due membrane delle cristae stesse, bensì spesso tra le superfici affacciate di due cristae vicine (Figura 1). Queste formazioni si sono dimostrate resistenti alla decalcificazione (EDTA 10% pH 7.3, HNO_3 5%) anche protratta fino a 2 h. (b) ammassi di varia dimensione di cristalli aghiformi (circa 600–800 Å × 30 Å) morfologicamente sovrapponibili a quelli descritti come cristalli di apatite in varie calcificazioni ectopiche (POLICARD et al.⁸; GIACOMELLI et al.⁹; BAUD et al.¹⁰). Gli agglomerati si presentano per lo più di forma tondeggianti o ovale e dell'ordine di grandezza dei mitocondri. Alcuni cristalli

¹ G. PALLADINI e A. BIGNAMI, *Atti Accad. naz. Lincei Rc.* **VIII** 36, 566 (1964).

² G. PALLADINI, L. APPICCIUTOLI, e A. BIGNAMI, *Atti Accad. naz. Lincei Rc.* **VIII** 37, 104 (1964).

³ G. PALLADINI, *Riv. Istochim.* **10**, 369 (1964).

⁴ G. PALLADINI, L. ALFEI, e A. CONFORTI, *Riv. Istochim.* **11**, 161 (1965).

⁵ S. M. KURTZ, *J. Ultrastr. Res.* **5**, 468 (1961).

⁶ M. J. KARNOVSKY, *J. biophys. biochem. Cytol.* **11**, 729 (1961).

⁷ E. MOLBERT, D. HUHN e F. BUCHNER, *Beitr. path. Anat.* **129**, 222 (1963).

⁸ A. POLICARD, C. A. BAUD, A. COLLET, H. DANIEL-MOUSSARD e J. C. MARTIN, *C. r. Soc. Biol., Paris* **155**, 1763 (1961).

⁹ F. GIACOMELLI, D. SPIRO e J. WIENER, *Proceedings of the 5th Internat. Congr. for Electron Microscopy, Philadelphia* (Academic Press, New York 1962).

¹⁰ C. A. BAUD e D. H. DUPONT, *Experientia* **22**, 18 (1966).

sono chiaramente disposti all'interno dei mitocondri già descritti, ma in altri casi gruppi di cristalli aghiformi si trovano nella sostanza opaca di fondo che occupa tutto il tubulo e non sembrano in relazione con alcuna struttura. L'esame delle sezioni decalcificate e successivamente contrastate con il Pb non ha rivelato alcun substrato all'interno degli agglomerati calcifici, in cui, del resto, gli aghi di apatite sono disposti senza alcun preciso orientamento, anche se si nota una certa tendenza a disporsi al centro degli ammassi in direzione perpendicolare a quella assunta dai cristalli periferici.

Nonostante una precisa ricerca, non abbiamo osservato mai fasci di fibre collagene frammisti ai detriti cellulari di questi tubuli in necrosi. È da notare come sia osservabile attorno agli aghi cristallini, una ganga di materiale amorfo più elettrone-opaco del fondo (Figura 2).

Lo studio ultrastrutturale della calcificazione da sublimato ci conferma che la deposizione del calcio avviene esclusivamente nel seno del detrito necrotico epiteliale, come già descritto al microscopio ottico dagli AA. classici (cfr. KAUFMANN et al.¹¹; KRITZ¹²); perciò i dati da noi ottenuti con i metodi istochimici mantengono il loro pieno valore. Una precisa indagine istochimica a livello elettronico non ci è stata possibile, ma la presenza della ganga elettrone-opaca pericristallina fa pensare alla presenza di mucopolisaccaridi acidi, come evidenziati in queste sedi

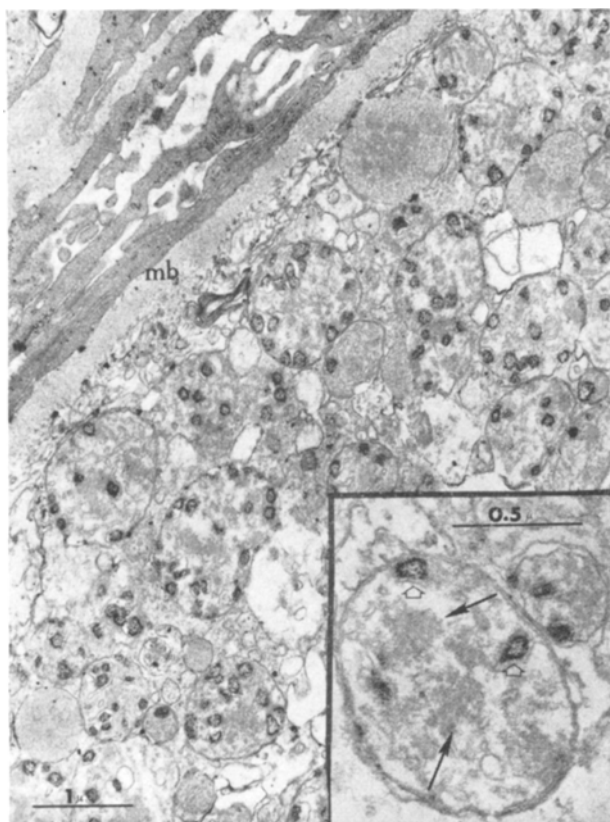


Fig. 1. Fotografia elettronica di un tubulo renale necrotico di ratto, 72 h dopo l'inoculazione del sublimato. Notare l'abbondanza dei mitocondri nel detrito tubulare, la persistenza della membrana basale (mb) e la presenza all'interno dei mitocondri di inclusioni anulari elettrone-opache. $\times 28000$. Nell'inserto, mitocondri a più forte ingrandimento ($\times 73000$) che mostrano gli inclusi ad anello (freccie vuote) nella matrice e la presenza di sostanza opaca (freccie piene). Fissazione in glutaraldeide seguita da osmio, inclusione in vestopal, colorazione con PbO.

dalle tecniche istochimiche (PALLADINI et al.⁴), e la cui secrezione da parte delle cellule renali tubulari è stata di recente descritta anche in cultura (MORARD e RIEDEL¹³). Per quel che riguarda l'intimo processo della precipitazione del sale, possiamo escludere che nel nostro caso, come in altri già descritti (ASCENZI e BENEDETTI¹⁴; LAFFERTY et al.¹⁵; MUZZI¹⁶) esso possa essere riportato alla precipitazione per «nucleazione» sulle bandature collagene (WEIDMAN¹⁷), perché il collagene risulta del tutto assente. Incerto invece, a causa della loro resistenza ai decalcificanti, è il ruolo delle già descritte formazioni elettrone-opache mitocondriali, che altri autori (LAFFERTY et al.¹⁵; MÖLBERT et al.⁷; MOLNAR¹⁸) hanno osservato in altri casi di calcificazioni ectopiche e a cui LAFFERTY, omologandole con quelle rinvenute da GREENAWOLT et al.¹⁹ al microscopio

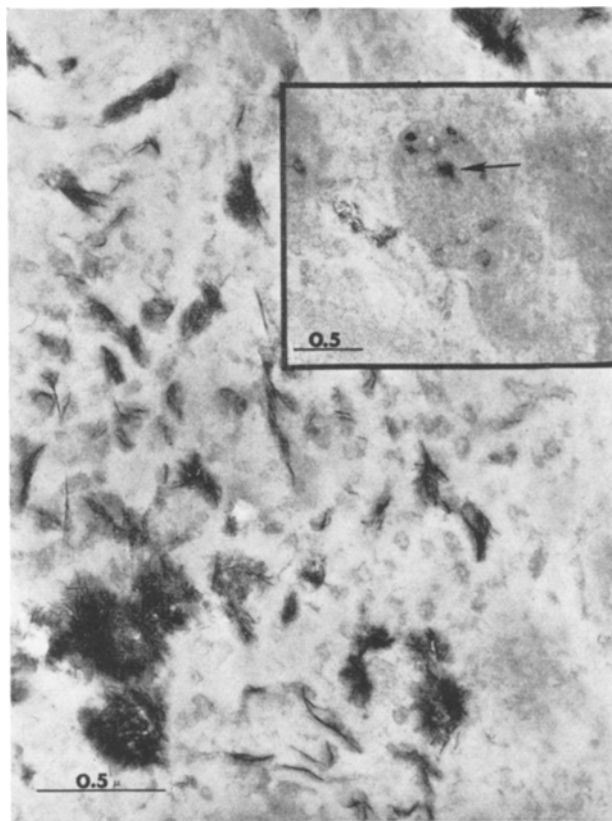


Fig. 2. Ammassi cristallini nel detrito tubulare, 72 h dopo l'avvelenamento. $\times 73000$. Nell'inserto, precipitati microcristallini nell'interno di mitocondri liberi nel detrito (freccia). Fissazione in glutaraldeide, inclusione in vestopal, colorazione con PbO. $\times 38500$.

- ¹¹ E. KAUFMANN e M. STAEMMLER, *Spezielle pathologische Anatomie* (W. de Gruyter, Berlin 1957), Vol. 2/1, p. 526.
- ¹² W. KRITZ, *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.* 57, 914 (1962).
- ¹³ J. C. MORARD e B. RIEDEL, *Experientia* 21, 621 (1965).
- ¹⁴ A. ASCENZI e E. L. BENEDETTI, *Acta anat.* 37, 370 (1959).
- ¹⁵ F. W. LAFFERTY, E. S. REYNOLDS e O. H. PEARSON, *Am. J. Med.* 38, 106 (1965).
- ¹⁶ E. MUZZI, XXXIV Convegno dell'U.Z.I. Pallanza 1965, in stampa.
- ¹⁷ S. M. WEIDMAN, in *International Review of Connective Tissue Research* (Ed., D. A. HALL; Academic Press, New York 1963), Vol. 1, p. 348.
- ¹⁸ Z. MOLNAR, *J. Cell Biol.* 27, 68A (1965).
- ¹⁹ J. W. GREENAWOLT, C. S. ROSSI e A. LEHNINGER, *J. Cell Biol.* 23, 21 (1964).

elettronico in mitocondri incubati in soluzioni di Ca^{++} e da questi identificate come precipitazioni di calcio fosfato, ha dato valore di iniziali precipitazioni calcaree a funzione «nucleante». In conclusione, quindi, lo studio ultrastrutturale della calcificazione renale da sublimato ci ha consentito di precisarne la morfologia submicroscopia e l'assenza di relazione con le fibre collagene; restano confermati i dati topografici ricavati dallo studio al microscopio ottico (PALLADINI et al.⁴).

Summary. Carrying on the researches on the biological process of calcium deposition, the role of the substructures in the precipitation of calcium salts in the loci of distro-

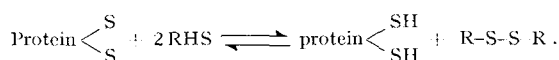
phic calcification of kidney tubules following sublimate injections has been investigated. In agreement with the histochemical data previously found, the presence of collagen fibres in these sites is excluded; the morphological appearance of crystal deposits is described. The importance of mitochondria in the calcium ion deposition in kidney tubules is discussed.

G. PALLADINI e S. CARAVITA

Istituto di anatomia comparata G. B. Grassi dell'Università di Roma (Italia), 14 marzo 1966.

Failure of Iodoacetate to Protect the Antigenic Power of Insulin from Cystein Inactivation

The 'thiol' compounds (cystein, glutathione, dimercaptopropanol, etc.) promote¹, even non-enzymatically, the linked reaction of oxide reduction between the -SS of the protein and the non-protein 'thiol' group.



The reduction of the insulin by cystein, accompanied by a loss of its physiological activity, is also rapid.

YALOW and BERSON² state that plasmatic insulin disappears when the specimen is incubated at pH 8 in the presence of 0.02M cystein. The present paper reports observations obtained when studying the action of iodoacetate and cystein on the stability of bovine insulin's antigenic power under certain experimental conditions and using HALES and RANDLE's immunological method³.

Method. Unlabelled insulin acts as a competitive inhibitor on the formation of the antigenic-antibody complex between labelled insulin and anti-insulin antiserum. Test samples of insulin are treated with iodoacetate and cystein, according to the conditions explained in the text and the previous paper⁴.

Stability of the antigenic power of insulin in the presence of cystein: Concentrates of 250 and 500 $\mu\text{u/ml}$ of bovine insulin are incubated for 2 h at 37°C with 0.02M and 0.01M of cystein at pH 7, 7.5 and 8 respectively and subsequently dialysed for 3 h against a sodium phosphate buffer of 0.040M at pH 7.4.

Quantities of the same samples are treated likewise but without the cystein stage.

Results. Although the incubation and dialysis in themselves induce a significant loss of activity, Table I shows clearly that after addition of cystein, the insulin becomes quite inactive at pH 7.5 and 8. About 25% of the original activities, however, remains at pH 7.

Effect of iodoacetate and cystein on beef insulin stability at pH 7.5: In its role as a blocking agent of the -SH groups, the iodoacetate may react quickly with cystein⁵, which suggests that an inhibitor of the insulin's biological action in vitro may be capable of protecting the hormone against the well-known inactivating effect of the amino acid. However, this does not occur, as can be seen in Table II, at least from the antigenicity viewpoint. In our experimental conditions with prior incuba-

Table I. Effect of cystein on beef insulin stability at different pH

pH	Control sample before incu- bation and dialysis $\mu\text{u/ml}$	Control sample incubated and dialysed with- out cystein $\mu\text{u/ml}$	Sample incubated with cystein and dialysed $\mu\text{u/ml}$ 0.02 M 0.01 M	
7	500	400	48	100
7	250	180	10	25
7.5	500	390	0	20
7.5	250	195	0	0
8	500	420	6	0
8	250	210	0	0

Table II. Effect of iodoacetate and cystein on beef insulin stability at pH 7.5

Reagent present during incubation	Residual activity ($\mu\text{u/ml}$) time (min)	
	0	120
None (without incubation)	500	500
None	500	360
$1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ iodoacetate + 0.02M cystein	-	0
$1 \cdot 10^{-4} \text{M}$ iodoacetate + 0.02M cystein	-	0
$1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ iodoacetate + 0.02M cystein	-	0
$1 \cdot 10^{-2} \text{M}$ iodoacetate + 0.02M cystein	-	0
$1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ iodoacetate + 0.01M cystein	-	0
$1 \cdot 10^{-4} \text{M}$ iodoacetate + 0.01M cystein	-	0
$1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ iodoacetate + 0.01M cystein	-	0
$1 \cdot 10^{-2} \text{M}$ iodoacetate + 0.01M cystein	-	0

Incubation was carried out at 37°C except where it is indicated. Tubes contained 500 $\mu\text{u/ml}$ of crystalline insulin and the indicated additions in phosphate buffer 0.040M, pH 7.5. After incubation the samples were dialysed out for 3 h and assayed for activity.

¹ Glutathione. Proceedings of the Symposium held at Ridgefield, Connecticut (Academic Press Inc., New York 1954).

² S. R. YALOW and A. S. BERSON, J. clin. Invest. 39, 1157 (1963).

³ C. N. HALES and P. J. RANDLE, Biochem. J. 88, 137 (1963).

⁴ C. LOPEZ-QUIJADA, Experientia 22, 330 (1966).

⁵ E. S. G. BARRON, Adv. Enzymol. 11, 201 (1951).

⁶ J. T. EDSALL, Biochemistry 4, 28 (1964).