

The colorimetric determination of imidazole ethanol indicated a concentration of  $2.6 \pm 0.4$  mM. This would represent a conversion of approximately 87%. However, TABOR<sup>8</sup> has pointed out that the diazotized *p*-nitro aniline method is subject to interference from many biological materials, which may enhance or inhibit the colour development. He states the accuracy of a determination may be  $\pm 10$ –20%. Moreover, in our experiment, a slight amount of colour probably arose from the imidazole acetic acid present in the sample. Therefore, the estimated concentration of imidazole ethanol should not be considered as accurate. However, it does indicate that most of the histamine was converted to imidazole ethanol.

ERLICH<sup>9,10</sup> reported the formation of unstated amounts of imidazole ethanol by yeast fermenting histidine. However, a strain of *S. cerevisiae* Sc6 in our experiment failed to produce imidazole ethanol from histidine or histamine, aerobically or anaerobically.

NAKAJIMA and SANA<sup>4</sup> suggest that imidazole ethanol may be formed from imidazole acetaldehyde by an alcohol

dehydrogenase. If *S. rouxii* has similar pathways for histamine degradation, our results suggest that in the yeast the activity of the alcohol dehydrogenase is much higher than that of the aldehyde oxidase.

*Zusammenfassung.* *Saccharomyces rouxii* PRL-411-64 wurde im Nährmedium mit Histamin als Stickstoffsubstrat kultiviert. Das Hauptprodukt des Metabolismus wurde papierchromatographisch als Imidazol-4-ethanol identifiziert.

T. LARUE and J. F. T. SPENCER

National Research Council of Canada, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon (Saskatchewan, Canada), May 31, 1966.

<sup>9</sup> F. ERLICH, Ber. dt. chem. Ges. 44, 139 (1911).

<sup>10</sup> F. ERLICH, Biochem. Z. 63, 388 (1914).

## Quantitative und qualitative Untersuchungen der Esteraseaktivität in normalen Granulozyten, normalen Lymphozyten und in leukämischen Zellen<sup>1</sup>

Die Esteraseaktivität wurde vorwiegend anhand histochemischer Methoden studiert<sup>2–7</sup>. Bis heute beschäftigten sich nur wenige Autoren mit quantitativen biochemischen Untersuchungen<sup>8,9</sup>. Eine qualitative elektrophoretische Analyse der Leukozytenproteine mit Esteraseaktivität wurde nur von ANDERSEN und SÖLVSTEN<sup>10</sup> ausgeführt. Sowohl die quantitativen biochemischen, wie auch die qualitativen elektrophoretischen Bestimmungen wurden jedoch mit heterogenen Leukozytenpräparationen durchgeführt.

In dieser Arbeit berichten wir über die Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Untersuchungen der Esteraseaktivität in Präparaten von normalen menschlichen Granulozyten, respektive Lymphozyten, mit einer Reinheit von über 90%, und in leukämischen Zellpräparaten nach kompletter Entfernung der reifen Granulozytenkomponente.

*Material und Methoden.* Die Granulozyten wurden nach der Methode von DIOGUARDI et al.<sup>11</sup> isoliert. Die Präparationen von Lymphozyten und leukämischen Myelozyten erfolgten nach der Methode von AGOSTONI und IDEO<sup>12</sup>. Die quantitative Bestimmung der Esteraseaktivität wurde nach der Methode von HARDIN et al.<sup>8</sup> ausgeführt. Die Charakterisierung der Esterasen erzielte man durch Agar-gelelektrophorese, auf Platten (15 cm lang, 4 mm dick) von 1% Gel, getränkt in Na-Veronalpuffer pH 8,2, Ionenstärke 0,05. Die Dauer der Elektrophorese betrug 2 h, mit einer Potentialdifferenz von 100 V. Zur Sichtbarmachung der Esteraseaktivität benutzte man  $\beta$ -Naphthylacetat (Mann Res. Lab. Inc.) und Ortho-Dianisidin-Tetrazoniumsalz (Sigma) in einem Phosphatpuffer pH 7,4. Die Platten wurden in dieser Lösung während 6 h in einem Trockenschrank bei 37°C inkubiert, anschliessend in 2%iger Essigsäure gewaschen und im Trockenschrank bei 37°C getrocknet. An Stelle von  $\beta$ -Naphthylamin wurden andere

Substrate, wie zum Beispiel Indoxylacetat und Naphthol-AS-D-Chloracetat verwendet; es wurden damit jedoch keine befriedigenden Resultate erzielt.

*Ergebnisse und Diskussion.* Die Esteraseaktivität zeigt, gegenüber den normalen Granulozyten, einen signifikanten Anstieg in den unreifen Zellen der myeloischen Leukämie (Tabelle). Gleich verhalten sich die lymphatischen Leukämiezellen gegenüber den normalen Lymphozyten (Tabelle). Im besonderen glauben wir unterstreichen zu können, dass diejenigen Fälle, welche Zellen mit geringerem Reifegrad enthielten, die höchsten Werte an Esteraseaktivität aufwiesen. Dies gilt sowohl für die myeloische, wie für die lymphatische Serie. Ein Anstieg der Esteraseaktivität in den Leukämiezellen wurde schon von FREI et al.<sup>9</sup> beobachtet, welcher, da er nicht über reine Zellpräparate verfügte, das Problem mathematisch zu lösen versuchte.

Die elektrophoretische Analyse zeigte in normalen Granulozyten, wie in normalen Lymphozyten vier Zonen

<sup>1</sup> Diese Forschung wurde vom Fonds des Lady Tata Memorial Trust unterstützt.

<sup>2</sup> M. M. NACHLAS und A. M. SELIGMAN, J. natn. Cancer Inst. 9, 415 (1949).

<sup>3</sup> R. J. BARNETT und A. M. SELIGMAN, Science 114, 579 (1951).

<sup>4</sup> G. GOMORI, J. Histochem. Cytochem. 1, 469 (1953).

<sup>5</sup> M. WACHSTEIN und G. WOLF, J. Histochem. Cytochem. 6, 475 (1958).

<sup>6</sup> W. C. MOLONEY, K. MCPHERSON und L. FLIEGELMAN, J. Histochem. Cytochem. 8, 200 (1960).

<sup>7</sup> R. BAGUENA CANDELA und G. FORTEZA BOVER, Revta clin. esp. 22, 324 (1961).

<sup>8</sup> E. B. HARDIN, W. N. VALENTINE, J. H. FOLLETTE und J. S. LAWRENCE, Am. J. med. Sci. 229, 397 (1955).

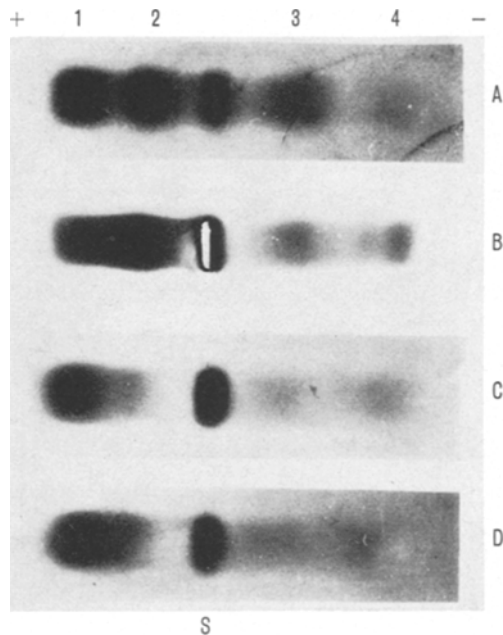
<sup>9</sup> J. FREI, CL. BOREL, G. HORWATH, B. CULLITY und A. VANNOTTI, Blood 18, 317 (1961).

<sup>10</sup> V. ANDERSEN und S. SÖLVSTEN, Experientia 19, 257 (1963).

<sup>11</sup> N. DIOGUARDI, A. AGOSTONI, G. FIORELLI und B. LOMANTO, J. Lab. clin. Med. 61, 713 (1963).

<sup>12</sup> A. AGOSTONI und G. IDEO, Experientia 21, 82 (1965).

mit Esteraseaktivität: zwei intensivere Zonen mit anodischer Migration und zwei mit kathodischer Wanderung. In den leukämischen Zellen ist die elektrophoretische Verteilung im wesentlichen ähnlich, wie in den normalen reifen Zellen. ANDERSEN und SÖLVSTEN<sup>10</sup>, welche nur drei



Elektrophoretische Trennung der Esteraseaktivität auf Agargel: (a) normale Granulozyten, (b) leukämische Myelozyten, (c) normale Lymphozyten, (d) leukämische Lymphozyten. Die leukämischen und die normalen Zellen zeigen ein analoges Elektrophorese-«Pattern».

| Leukozytäre Esteraseaktivität in $\mu M \cdot 10^{-11}/\text{min}/\text{Leukozyt} \pm \text{Standard Error}$ |                                   |                |                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------|----------------------------------------------|
| Zahl der Fälle                                                                                               |                                   | Zahl der Fälle |                                              |
| 4                                                                                                            | Granulozyten<br>= $19,3 \pm 0,38$ | 5              | normale Lymphozyten<br>= $15,4 \pm 0,34$     |
| 4                                                                                                            | Myelozyten<br>= $26,3 \pm 1,29$   | 12             | leukämische Lymphozyten<br>= $21,0 \pm 1,16$ |
| $p < 0,001$                                                                                                  |                                   | $p < 0,001$    |                                              |

Fractionen mit Esteraseaktivität fanden, konstatierten ebenfalls keine Unterschiede im Elektrophorese-«Pattern» der Esterasen zwischen normalen und leukämischen Zellen.

**Summary.** A quantitative and qualitative analysis of the carboxylic esterases of normal granulocytes, normal lymphocytes and leukemic cells was performed. In the myeloid leukemic cells and in the lymphatic leukemic cells, the esterase activity was significantly increased. By means of electrophoretic fractionation, four zones with esterase activity were detected in normal granulocytes and lymphocytes; the electrophoretic pattern of the leukemic cells was similar to that of the normal cells.

A. AGOSTONI, G. C. SECCHI und N. GERVASINI  
mit technischer Assistenz von  
M. SCHWEIZER und M. C. TONAZZI

*Institut der Medizinischen Universitätsklinik,  
Milano (Italien), 24. Juni 1966.*

**Normal Human Red Cells Treated with 2-Aminoethylisothiuroniumbromide (AET). Acetylcholinesterase Inactivation and Susceptibility to Acid Lysis in vitro**

Among the few enzymes recognized in the red cell membrane, acetylcholinesterase (AChE) is one of the most investigated. A deficiency in erythrocyte AChE activity has been reported in a variety of hematologic disorders. The only disease so far characterized by reduction in erythrocyte AChE is paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)<sup>1-3</sup>. Another peculiarity of this disease is the in vitro hemolysis caused by acidified normal serum; however, there is no proof that AChE deficiency by itself leads to increased susceptibility to hemolysis. It has been demonstrated that normal human erythrocytes treated with proteolytic enzymes or sulfhydryl compounds resemble those of PNH in the property of acid hemolysis<sup>4,5</sup> and have a remarkable deficiency of stromal AChE activity<sup>6-9</sup>.

We have investigated the relationship between hemolysis by acidified serum and loss of AChE activity in normal erythrocytes treated with AET. The blood of healthy

adults was drawn with heparin; the red cells, separated by centrifugation and washed thrice with saline, were treated with AET as previously described<sup>5</sup>, but for various periods of incubation or with solutions of different concentrations. After treatment the erythrocytes were subjected to the tests of Ham and of Crosby. The red cell AChE activity was determined in normal and treated red

<sup>1</sup> G. DE SANDRE, G. GHIOTTO, and G. MASTELLA, *Acta med. patav.* 16, 310 (1956).  
<sup>2</sup> J. V. AUDITORE and R. C. HARTMANN, *Am. J. Med.* 27, 401 (1959).  
<sup>3</sup> J. METZ, B. A. BRADLOW, S. M. LEWIS, and J. V. DACIE, *Br. J. Haemat.* 6, 372 (1960).  
<sup>4</sup> S. YACHNIN, M. T. LAFORET, and F. H. GARDNER, *Blood* 17, 83 (1961).  
<sup>5</sup> G. SIRCHIA, S. FERRONE, and F. MERCURIALI, *Blood* 25, 502 (1965).  
<sup>6</sup> B. G. FIRKIN, R. W. BEAL, and G. MITCHELL, *Australas. Ann. Med.* 12, 26 (1963).  
<sup>7</sup> F. HERZ, E. KAPLAN, and J. H. STEVENSON, *Nature* 200, 901 (1963).  
<sup>8</sup> G. PERONA, S. CORTESI, G. GHIOTTO, and G. DE SANDRE, *Br. J. Haemat.* 11, 171 (1965).  
<sup>9</sup> G. SIRCHIA, S. FERRONE, R. MILANI, and F. MERCURIALI, *Blood* 28, 98 (1966).