

Changes in alanine transaminase activity, pyridoxal phosphate and glycogen concentration in the liver in riboflavin deficiency, averages \pm S.D.

Nutritional state	No. of animals	Liver						
		Weight, g/100 g body wt.	Alanine transaminase activity, U ^a		Pyridoxal phosphate in μ g		Glycogen in mg	
			Per mg	Per 100 g body wt. ^b	Per g	Per 100 g body wt.	Per g	Per 100 g body wt.
Group A (normal pair-fed)	7	2.78 \pm 0.092	1.2 \pm 0.02	3.336 \pm 0.27	5.14 \pm 0.126	18.07 \pm 1.126	0.156 \pm 0.035	0.433 \pm 0.087
Group B (riboflavin deficient)	8	3.848 \pm 0.06	3.07 \pm 0.67	12.88 \pm 1.5	7.10 \pm 0.17	26.65 \pm 1.71	0.186 \pm 0.021	0.713 \pm 0.10

^a U = μ moles of keto acid produced per hour. ^b Expressed in thousands.

pected to be decreased. This may result in an increased free amino acid pool and consequently an elevation of alanine transaminase activity in the liver of riboflavin-deficient rats. Pyridoxal phosphate, a cofactor for alanine transaminase, is increased under this condition. This may also be the reason for increased alanine transaminase activity in the liver of riboflavin-deficient rats. NICHOL et al.¹ and EISENSTEIN² observed a direct correlation between alanine transaminase activity and glycogen deposition. In the present investigation also an increase in alanine transaminase activity is associated with more deposition of glycogen in the liver of riboflavin-deficient rats.

It is noted in the introduction that suppression of ACTH release by the pituitary presumably lowers the alanine transaminase activity in the liver¹. Further treatment of intact rats with cortisol¹¹⁻¹³ or cortisone^{11,12,14,15}, or adrenalectomized rats with cortisol^{12,13}, increased the alanine transaminase activity of the liver. It has also been observed that s.c. injection of ACTH produced a twofold increase in the alanine transaminase activity of the liver¹², and adrenalectomy lowered it¹³. In the present investigation alanine transaminase activity is increased in the liver of riboflavin-deficient rats. This suggests rather more release of ACTH by the pituitary and consequent stimulation of adrenal cortical function, and is in agreement with the earlier reports⁶. Recently the authors¹⁶ observed an increased plasma ascorbic acid level in riboflavin deficiency, which is also suggestive of increased adrenal cortical secretion as plasma ascorbic acid level increases on administration of cortisone to normal rats¹⁷. These studies might therefore provide indirect evidence of increased adrenal cortical activity in riboflavin deficiency.

Zusammenfassung. 45tägiger Riboflavinmangel bewirkte bei männlichen Albinoratten in der Leber eine Erhöhung der Alanin-Transaminase-Aktivität sowie des Pyridoxal- und Glykogengehaltes. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Aktivität der Nebennierenrinde beim Riboflavinmangel erhöht ist.

A. K. CHATTERJEE, S. C. JAMDAR, and B. B. GHOSH¹⁸

Department of Physiology, University College of Science, Calcutta (India), July 14, 1966.

- ¹¹ F. ROSEN, N. R. ROBERTS, L. E. BUDNICK, and C. A. NICHOL, *Science* 127, 278 (1958).
- ¹² F. ROSEN, N. R. ROBERTS, L. E. BUDNICK, and C. A. NICHOL, *Endocrinology* 65, 256 (1959).
- ¹³ H. R. HARDING and F. ROSEN, *Am. J. Physiol.* 201, 271 (1961).
- ¹⁴ G. H. BEATON, D. M. CURRY, and M. J. VEEN, *Archs Biochem. Biophys.* 70, 288 (1957).
- ¹⁵ F. GAVOSTO, A. PILDERI, and A. BRUSCA, *Biochim. biophys. Acta* 24, 250 (1957).
- ¹⁶ A. K. CHATTERJEE, S. C. JAMDAR, and B. B. GHOSH, unpublished.
- ¹⁷ O. BODANSKY and W. L. MONEY, *Endocrinology* 55, 173 (1954).
- ¹⁸ Acknowledgment: The authors wish to express their sincere gratitude to Prof. S. R. MAITRA, Head of the Department of Physiology, Calcutta University, for constant encouragement and for providing the laboratory facilities. The authors are also thankful to Dr. D. SEN of the Department of Applied Chemistry, Calcutta University, for translating the English summary into German.

Versuche zum Calciphylaxie-Phänomen an HeLa-Zellkulturen¹

Als Calciphylaxie definierte SELYE² eine durch einen doppelten Mechanismus erzeugte Gewebsreaktion, die zu einer Calciumablagerung führt. Sie wird vermittelt Vorbehandlung mit einer calciummobilisierenden Substanz (Sensibilisierung), der nach Ablauf einer bestimmten Zeitspanne («critical period») die Nachbehandlung mit gewissen chemischen oder mechanischen Agenzien (Pro-

vokatoren, Beizstoffe, «challengers») folgt, ausgelöst. Ablagerung von Calciumsalzen erfolgt dort, wo der Provokator mit sensibilisiertem Gewebe in Berührung kommt. Demgegenüber bedeutet die Calcergie eine Ausfällung von

- ¹ Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.
- ² H. SELYE, *Calciphylaxis* (University of Chicago Press, Chicago 1962).

Calciumsalzen im Gewebe nach Applikation von sogenannten «direkt wirkenden Verkalkungstoffen» oder Calcergenen (SELYE²). Unter den Provokatoren besitzt das Eisen, unter den Calcergenen das KMnO_4 eine Kardinalposition. Bei beiden biologischen Prinzipien handelt es sich nicht um eine dystrophische Kalkablagerung.

Während dem Phänomen der Calciphylaxie und der Calcergie im Tierexperiment recht eingehend nachgegangen wurde, fehlen im Schrifttum bisher Angaben über Versuche einer calciphylaktischen Reaktion in der Gewebs- und Zellkultur. Im folgenden möchten wir über experimentelle Ergebnisse, die wir anhand von HeLa-Zellen im Hinblick auf die calciphylaktische Reaktion gewannen, berichten.

Methodik. Die HeLa-Zellen wurden in Salzlösung nach HANKS mit 20% inaktiviertem Kalbsserum, 0,5% Lactalbuminhydrolysat und 0,1% Hefeextrakt direkt auf Deckgläschen in Vierkantflaschen gezüchtet. Am 3. oder 4. Kultivationsstag entnahmen wir das Zellmaterial und übertrugen es in Rollröhrchen mit Nährmedium, dem die calciummobilisierenden Substanzen Parathorm® und Vi-De 3 Hydrosol (Fa. Wander) zur «Sensibilisierung» hinzugefügt wurden. Um einer möglichen Inaktivierung des Parathormons bei 37°C vorzubeugen, wurden die Kulturen täglich mit frischem Nährmedium und Parathormon gefüttert. Das Parathormon kam in den Mengen von 2, 5, 10, 15 und 20 Collip-Einheiten, das Vitamin D₃ in 10², 10³, 10⁴ und 10⁵ I.E. zur Anwendung, wobei die Einwirkungsdauer jeweils 12, 24 und 48 h betrug. Danach wurde das Zellmaterial entnommen und teils fixiert, teils zur «Beizung (Provokation)» für dieselbe Zeitdauer in Rollröhrchen mit Nährmedium unter Zusatz von $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und der Eisen(III)-Dextran-komplex-Lösung Myofer® gelegt und bei 37°C weiter bebrütet. Die Eisensalze verwandten wir in den Mengen von $0,25 \cdot 10^{-4} M$ und $1 \cdot 10^{-5} M$, die Eisen(III)-Dextran-komplex-Lösung entsprach dem Äquivalent von 1, 5, 10 und 20 mg komplex gebundenem, dreiwertigem Eisen. Teilweise liessen wir die genannten Provokatoren simultan mit Parathormon bzw. Vitamin D₃ auf die Zellkulturen einwirken.

Neben diesen Versuchsreihen setzten wir eine weitere zur Prüfung des Einflusses von KMnO_4 auf etwaige Ablagerungen von Calcium in den HeLa-Zellen an. Das KMnO_4 wurde der Nährflüssigkeit in den Mengen von $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-1}$ und 1 mg hinzugegeben, wobei wir eine 12- und 24stündige Exposition wählten.

Das Kulturmaterial spülten wir vor jeder Übertragung und Fixierung mit physiologischer NaCl-Lösung. Die Fixierung erfolgte in Alkohol, das Calcium wurde mit Naphthalhydroxamsäure (VOIGT³) nachgewiesen.

Ergebnisse. Die im Anschluss an die Applikation von Parathorm® und Vitamin D₃ durchgeführte Reaktion nach VOIGT³ liess kein Calcium nachweisen. Auch nach der Provokation mit den Eisensalzen und dem Myofer® konnte ein positiver Calciumnachweis nicht erbracht werden. Dies galt ebenfalls für die Kulturen, die in Anwesenheit von Parathorm® bzw. Vitamin D₃ und des Provokators bebrütet worden waren. Die mit KMnO_4 behandelten Zellkulturen zeigten wie nach der Sensibilisierung und Provokation keine Bildung von Calciumnaphthalhydroxamat.

Diskussion. Der hochempfindliche Calciumnachweis nach VOIGT³ erfasst noch 0,1 γ – Ca/ml. Bei unserer Versuchsanordnung konnte in den Kulturen eine Calciumablagerung im Sinne der calciphylaktischen Reaktion oder Calcergie mit dieser histotopochemischen Methode nicht erzielt werden.

Der Einfluss von Nebenschilddrüsenhormon und Vitamin D auf Calciumablagerungsvorgänge in Gewebekulturen ist mehrfach im Schrifttum diskutiert worden. Während diese Substanzen für manche Autoren beim Calcifizierungsvorgang in vitro als fördernde Faktoren gelten (CROXATTO⁴, v. BRAND et al.⁵, und andere), sind sie von anderen, die ihre Wirkung auf Kulturen prüften, nicht im Zusammenhang mit Calciumablagerungsprozessen erwähnt (NORDMANN et al.⁶, BORLE et al.⁷, und andere). Andererseits wurden auch morphologische Veränderungen der Thyreoidea von der Calciumkonzentration des Nährmediums abhängig gemacht. RAISZ⁸ demonstrierte, dass die Grösse der Nebenschilddrüsenzellen, ihr Teilungsrhythmus und die Kern-Plasmarelation eine Funktion der Calciummenge darstellen.

Die Ergebnisse der von uns vorgenommenen Untersuchungen lassen nicht auf eine calcifizierende Wirkung von Parathorm® und Vitamin D₃ im Zellmaterial schliessen.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass in HeLa-Zellkulturen eine Calciumablagerung durch höhere Eisengaben induziert werden kann (MATHAS und MÜLLER⁹). Calciumniederschläge folgten auf eine Ferrifikation des Zellmaterials und konnten erst nach Fe-Exposition, die eine Subkultivation nicht mehr ermöglichte, erzielt werden. Dabei schienen gewisse Gemeinsamkeiten mit den Vitalbeizen der Calciphylaxie zu bestehen. Sollte nun eine Calciumablagerung im Sinne der calciphylaktischen Reaktion bei unseren experimentellen Bedingungen erfolgen, müsste die als Beizstoff in Frage kommende Eisenmenge in den Bereichen liegen, die von sich aus eine Ablagerung von Calcium nicht auslösen können. Dass sich solche Befunde nicht erheben liessen, könnte neben den verschiedenen Lebensbedingungen der Zellen in vivo von denen in vitro auf andere spezifisch biochemische Vorgänge, die sich systemisch und lokal in den calciphylaktischen Läsionsgebieten abspielen und offenbar auch eine Fernsteuerung (zum Beispiel durch die Hypophyse) erfahren, zurückzuführen sein. Ähnliche ätiologische Faktoren dürften für den negativen Ausfall des histotopochemischen Calciumnachweises nach Applikation von KMnO_4 – von SELYE² geradezu als Prototyp eines Calcergens in vivo angegeben – verantwortlich gemacht werden.

Summary. An attempt was made to induce calciphylaxis and direct calcifying reaction according to SELYE² in HeLa cell cultures. With our experimental conditions, we obtained neither a calciphylaxis nor a direct calcifying reaction. We suppose that in vivo other mechanisms of metabolism (e.g. transmission of hormonal or nervous impulses) play an important role.

B. MATHAS und W. MÜLLER

Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Abteilung für Tumorforschung, Goldenfelsstr. 21, 5 Köln-Lindenthal (Deutschland), 15. Juni 1966.

³ G. T. VOIGT, Acta histochem. 4, 122 (1957).

⁴ H. CROXATTO, C. r. Soc. Biol. 108, 117 (1931).

⁵ TH. VON BRAND und E. G. NAUCK, Arch. exp. Zellforsch. 14, 276 (1933).

⁶ M. NORDMANN und K. HÖRGER, Arch. exp. Zellforsch. 13, 430 (1932).

⁷ A. B. BORLE und W. F. NEUMANN, J. Cell Biol. 24, 316 (1965).

⁸ L. G. RAISZ, Fedn Proc. Am. Soc. exp. Biol. 21, 207 (1962).

⁹ B. MATHAS und W. MÜLLER, Naturwissenschaften 53, 415 (1966).