

The Leakage of Intracellular Constituents from Heated Suspensions of *Staphylococcus aureus*

The leakage from bacteria of intracellular constituents has been shown to be caused by treatment of the cells with various chemical and physical agents¹⁻⁸. This leakage is usually determined by measuring the amount of 260 nm-absorbing material and of pentoses (both of which are indicative of the release of nucleic acid-like substances) present in the supernatant fluids of treated cells. In previous studies⁸ with suspensions, in water and in the osmotic stabilizer, 1 *M*-sucrose, of *Staphylococcus aureus* NCTC 3761, it was found that (I) the initial rate of leakage of 260 nm-absorbing substances was much greater at 60°C than at 50°C, (II) the total amount of 260 nm-absorbing material was less at 60°C than at 50°C, and (III) 1 *M*-sucrose afforded some protection against such leakage (but not against death) at 50°C but not at 60°C. It was thus decided to investigate more fully the leakage material from heated suspensions of this organism, in the hope that further information would be obtained on the mechanism of thermal injury.

The organism was grown for 18 h in double strength nutrient broth (Oxoid Laboratories, London, England) at 37°C. The culture was centrifuged, and the pellet washed twice with sterile glass-distilled water and finally resuspended in water to give $c.3 \times 10^9$ viable cells/ml. One part of this suspension was added to 2 parts of sterile water or sterile 1.5 *M* sucrose, previously equilibrated at 50°C or 60°C in thermostatically-controlled water-baths.

Aliquots of heated suspensions were removed when required and centrifuged at 4000 *g* for 30 min. Supernatant fluids were carefully removed and subjected to the following analyses: (1) absorption at 260 nm was determined in the Unicam SP 800 spectrophotometer, using 1 mm cells and the appropriate blank; (2) amino acids were determined by the method of MOORE and STEIN⁹, using leucine as reference; (3) protein was determined by the method of LOWRY et al.¹⁰, using crystalline albumin (British Drug Houses, Ltd., London) as reference. Standard curves had previously been constructed for leucine and albumin in both water and 1 *M*-sucrose.

The results of experiments with bacteria stored at 50° and 60° are shown in Figures 1 and 2. Amino acid leakage from the endocellular pool¹¹ at both temperatures appears

¹ M. R. J. SALTON, *J. gen. Microbiol.* 5, 391 (1951).

² B. A. NEWTON, *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 8, 62 (1958).

³ W. B. HUGO and A. R. LONGWORTH, *J. Pharm. Pharmacol.* 18, 569 (1966).

⁴ J. J. IANLOLO and Z. J. ORDAL, *J. Bacteriol.* 91, 134 (1966).

⁵ M. C. ALLWOOD and A. D. RUSSELL, to be published (1967).

⁶ A. D. RUSSELL and D. HARRIES, *Appl. Microbiol.* 15, 407 (1967).

⁷ R. E. STRANGE and J. R. POSTGATE, *J. gen. Microbiol.* 36, 393 (1964).

⁸ J. R. POSTGATE and J. R. HUNTER, *J. appl. Bact.* 26, 405 (1963).

⁹ S. MOORE and W. H. STEIN, *J. biol. Chem.* 176, 367 (1948).

¹⁰ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).

¹¹ E. F. GALE, *The Chemical Activities of Bacteria*, 3rd edn (University Tutorial Press, London 1951).

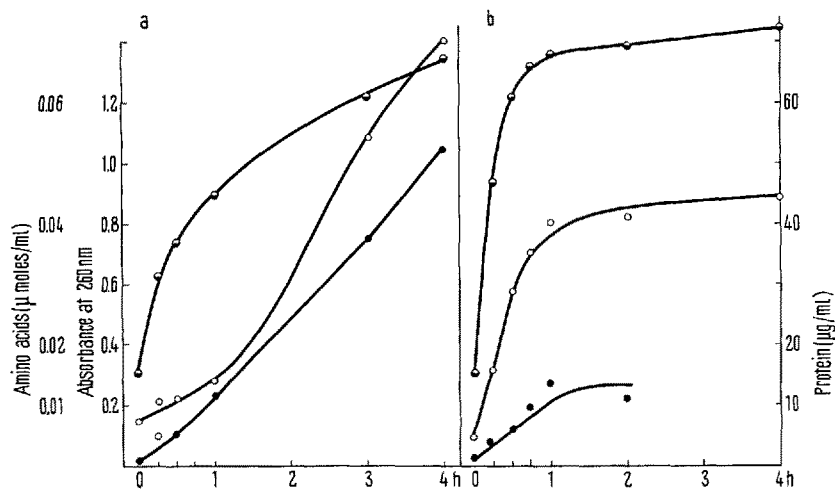


Fig. 1. Leakage of intracellular constituents from suspensions in water of *S. aureus* at 50°C (a) and 60°C (b). ○—○, 260 nm-absorbing material; ●—●, protein; ●—●, free amino acids.

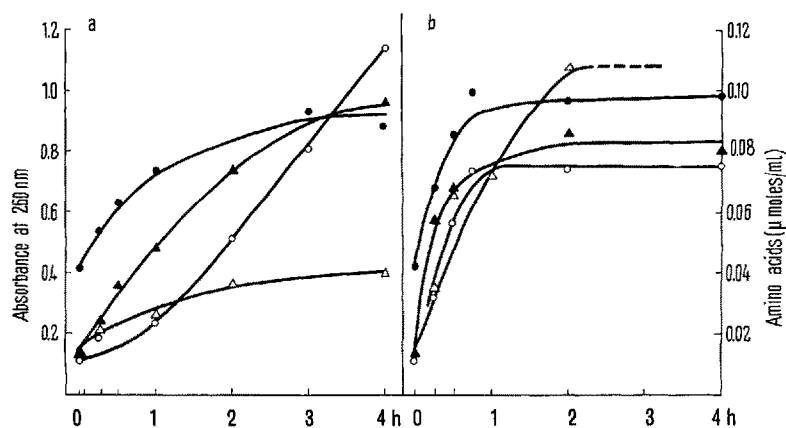


Fig. 2. Comparison of the effect of water and 1 *M*-sucrose on the leakage of intracellular constituents from suspensions of *S. aureus* at 50°C (a) and 60°C (b). Suspensions in water: ○—○, 260 nm-absorbing material; ●—●, free amino acids. Suspensions in 1 *M*-sucrose: △—△, 260 nm-absorbing material; ▲—▲, free amino acids.

to precede leakage of 260 nm-absorbing material and is not prevented by the osmotic stabilizer, sucrose. However, although sucrose does not protect bacteria against leakage of 260 nm-absorbing material at 60 °C (Figure 2b), considerable protection is conferred at 50 °C (Figure 2a). Sucrose has also been found⁸ to have no influence on the rate of death of this organism at 50 °C and 60 °C. Thus, one of the initial factors causing thermal injury in *S. aureus* may be the passage of amino acids across the damaged cytoplasmic membrane into the external environment.

One other finding is of interest: the release of protein is considerably higher at 50 °C than at 60 °C (Figure 1a, b). The reason for this has not yet been investigated, but

could be caused by the coagulation of protein material in the cytoplasm at the higher temperature.

Résumé. Une analyse a été fait des substances que perdent les cellules de *Staphylococcus aureus* chauffées à 50 °C et 60 °C. Ces substances comprennent des acides aminés, de la protéine et des substances absorbantes à une longueur d'onde de 260 nm.

M. C. ALLWOOD and A. D. RUSSELL

Welsh School of Pharmacy, Welsh College of Advanced Technology, Cardiff (Great Britain), 10th May 1967.

STUDIORUM PROGRESSUS

Zellmorphologische Veränderungen im Vaginalabstrich nach Strahleneinwirkung¹

Im Jahre 1928 hat der in den Vereinigten Staaten lebende griechische Arzt PAPANICOLAOU² die ersten Arbeiten über zytologisch erfassbare Karzinome veröffentlicht. Seither ist die Methode allgemein verbreitet und anerkannt. Besondere Erfolge konnten auf dem Gebiete der Frühdiagnostik der Uterus-Karzinome, Bronchial-Karzinome und anderen erreicht werden. Die Krebs-Zytdiagnostik hat sich ferner zu einer wissenschaftlichen Methode entwickelt. So werden heute Kern- und Plasmaveränderungen atypisch veränderter Epithelien mit weiterentwickelten Methoden, z.B. Zytochemie, Autoradiographie, Kernmessungen und Elektronenmikroskopie untersucht.

Eine besonders schwierige Aufgabe war es von jeher für den Zytologen, Abstriche nach durchgeführter Strahlentherapie zu beurteilen. Die Zellveränderungen nach Röntgen- und Radiumbestrahlung sind sehr verschiedenartig (siehe Figuren 1–9). Die vorliegende Arbeit befasst sich insbesondere mit der Bedeutung dieser Untersuchungsmethode hinsichtlich einer prognostischen Beurteilung und Verlauf bei karzinomatösen Veränderungen

sowie mit der Beurteilung der Strahlensensibilität einer krebsigen Veränderung.

(1) Einige den Gynäkologen, Radiologen und auch Zytologen interessierende Fragen sollen vorerst besprochen werden.

(1) *Kann ein infiltrativ wachsendes Karzinom im zytologischen Abstrich nachgewiesen werden?* Die Frage, ob infiltrativ wachsend oder nicht, wird immer nur durch die Histopathologie beantwortet. Zur Sicherung der Diagnose müssen bei positiven Abstrichen eine oder mehrere Biopsien mit nachfolgenden Serienschchnittuntersuchungen durch den Histologen erfolgen. Zusätzlich muss der erfahrene Kliniker bei der bimanuellen Untersuchung der Patientin die Ausdehnung des Karzinoms – beim Collum-Karzinom entsprechend den 4 Stadien, aufgestellt von der Völkerbundskommission im Jahre 1920 – feststellen.

(2) *Kommt es während der Bestrahlung zu Zell- und Kernveränderungen?* Anhand von histologischen Präparaten kann man gewisse Rückschlüsse auf die Zellpopulation eines Abstriches gewinnen. Man kann durch wiederholte Zellentnahmen, welche für die Patientin keine Belastung bedeuten, die karzinomatösen Zellen quantitativ auszählen und über Zell- und Kerngrösse oder gewisse Kerneigenschaften eine sichere Aussage machen. Die Kern- und Zelleigenschaften erfahren während dem Einfluss aktinischer Strahlen Veränderungen. Figur 1 zeigt solche Modifikationen, die unter anderem in einem Aufblähen (blowing-up) der Zelle und des Kernes besteht. Dieses führt schlussendlich zum Zerfall der Zelle. Die Kerne können sich ihrerseits ebenfalls stark verändern. Es kann zu einer Hyperchromasie und Vergrößerung des Kernes führen bis zum Zerfall, bzw. zum Auftreten von mehrkernigen Zellen.

(3) *Kann der Vaginalabstrich etwas über die Strahlensensibilität des Tumors und des anliegenden Gewebes während und nach der Einwirkung der aktinischen Therapie aussagen?* Die Strahlensensibilität kann durch wieder-

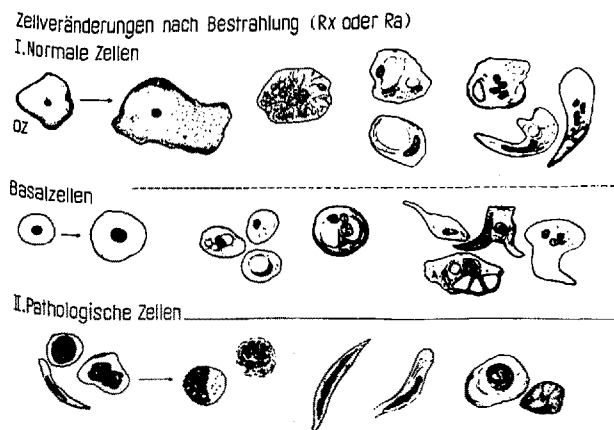


Fig. 1. Zellveränderungen nach Bestrahlung (RX oder RA), halbschematisch dargestellt.

¹ Diese Arbeit ist Herrn Prof. A. WERTHEMANN, Vorsteher der Pathologisch-Anatomischen Anstalt der Universität Basel, zum 70. Geburtstag gewidmet.

² G. N. PAPANICOLAOU, Anat. Rec. 38, 55 (1928); *Atlas of Exfoliative Cytology* (Harvard Univ. Press 1954).