

und McINTYRE⁸, für 4-Aminophenazon durch oxydative Kondensation mit Phenol nach HASLINGER und STRUNZ⁹ und für Dimethylaminophenazon durch das Jodatverfahren nach MADAUS und MEYER¹⁰.

Besonders bemerkenswert ist die Löslichkeit in der Lezithinmischung. Das Lezithin musste zur Erniedrigung der Viskosität mit Benzin (1:1, g/g) versetzt werden. Es kann angenommen werden, dass die Löslichkeit der Arzneimittel in reinem Lezithin noch grösser ist. Demnach lassen sich bei den von uns untersuchten Verbindungen erhebliche Unterschiede in der Löslichkeit in Benzin,

Löslichkeit von Phenazon, 4-Aminophenazon und Dimethylaminophenazon in g/100 g Benzin, Rinderklauenöl, Schweineschmalz, Lezithin + Benzin (1 + 1) und Chloroform bei 37°C

	Phenazon	4-Amino-phenazon	Dimethylamino-phenazon
Benzin, Kp 59 °C	0,072	0,075	0,81
Rinderklauenöl	0,74	0,36	2,00
Schweineschmalz	0,56	0,45	1,70
Lezithin-Benzin (1 + 1)	13,0	14,0	12,6
Chloroform	90,5	87,9	120,6

Chloroform, Triglyzeriden und Phosphatiden feststellen. Bei der Bestimmung des sogenannten Antipyrinraumes als Mass des Gesamtkörperwassers können diese Unterschiede nicht vernachlässigt werden und bieten eine Erklärung für den bekannten Fehler dieser Methode¹¹.

Summary. The solubility of phenazon, 4-aminophenazon and aminophenazon in heptan, neatsfoot oil, lard, lecithin and chloroform was determined. The results demonstrate that the solubility in chloroform or heptan cannot be taken as a measure of the fat-solubility, and that the solubility of phenazon in lipids has to be taken into consideration in determining the so-called antipyrin-space as a measure of total body water.

H. HANKE und W. KLINGER

*Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie und
Institut für Pharmakologie der Friedrich-Schiller-
Universität, Jena (DDR), 27. April 1967.*

⁸ D. DAVIDSON und I. McINTYRE, Biochem. J. 62, 37 (1956).

⁹ R. HASLINGER und W. STRUNZ, Arzneimittel-Forsch. 4, 299 (1954).

¹⁰ G. MADAUS und F. MEYER, Arzneimittel-Forsch. 1, 375 (1951).

¹¹ D. P. MERTZ, *Die extrazelluläre Flüssigkeit* (Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1962).

Wirkung von Actinomycin auf das Enzymmuster der Ratteniere während der Entwicklung

Während der Organogenese nimmt die Aktivität zahlreicher Enzyme laufend zu. Die hierbei wirksamen Regulationssysteme sind noch weitgehend unbekannt. Es bedarf der Klärung, ob die Aktivitätszunahme durch Regelkreise innerhalb der Zelle gesteuert werden kann, oder ob allein übergeordnete Systeme (z.B. das Endokriniun) eine Rolle spielen. Eine experimentelle Bearbeitung dieser Fragestellung scheint durch Eingriffe in die (Enzym-) Eiweißsynthese der Zelle möglich. Actinomycin D unterbindet die Bildung von Messenger-RNS und damit die Transskription der genetischen Information¹. Als Modell für diese Untersuchungen eignet sich die Niere der Ratte besonders gut, da dort Zonen unterschiedlicher Aktivität bestehen (Rinde, Zona subcorticalis)², und der Terminplan der Entwicklung für eine Reihe von Enzymen bekannt ist. – Wir haben männlichen und weiblichen Ratten beginnend am 12., 13., 14. und 15. Lebenstag je 3 Tage lang pro Tag pro 10 g Körpergewicht 2 µg Actinomycin D (50 µg in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung) i.p. verabfolgt. Die Injektionen erfolgten jeweils zwischen 17.00 und 19.00 Uhr, die Tötung zwischen 08.00 und 09.00 Uhr am Tage nach der letzten Injektion. Zur Kontrolle erhielten Tiere statt Actinomycin D eine entsprechende Menge 0,9%ige NaCl-Lösung injiziert; außerdem untersuchten wir unbehandelte Kontrolltiere. Die Tötung erfolgte durch Dekapitation. 10 µ dicke Kryostatschnitte. Nachweis der alkalischen Phosphatase nach GOMORI (Modifikation nach PEARSE³) und v. DEIMLING⁴, der sauren Phosphatase nach BARKA⁵ sowie von Leucinaminopeptidase, unspezifischer Esterase, NADH, Glucose-6-Phosphatase und β-Hydroxybuttersäuredehydro-

genase. – Von allen nachgewiesenen Fermenten zeigt sich ein deutlicher Effekt bei Tieren beiderlei Geschlechts nur für alkalische Phosphatase. Betroffen sind in erster Linie die geraden Abschnitte der Hauptstücke (Zona subcorticalis). Nach dreitägiger Behandlung mit Actinomycin kommt es beim Weibchen zu einer deutlichen Aktivierung der alkalischen Phosphatase in der Zona subcorticalis. Die Aktivität dieses Fermentes, die bei den Kontrolltieren in dieser Zone zwischen dem 12. bis 28. Lebenstag geringer als in der Rinde ist, überschreitet nach Behandlung die Rindenaktivität. Beim Männchen wird durch Actinomycinbehandlung ebenfalls die Zona subcorticalis aktiviert, jedoch erreicht die Aktivität nur die der Rinde. Ähnlich verhält sich bei männlichen Tieren die saure Phosphatase. In lokalisatorischer Hinsicht tritt durch Actinomycin bei keinem der Fermente lichtmikroskopisch eine nachweisbare Veränderung ein: alkalische Phosphatase ist an den Bürstensaum, saure Phosphatase an das Cytoplasma gebunden.

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass Actinomycin an der Ratteniere während der Entwicklung nicht unmittelbar in das Bildungssystem der Phosphatasen eingreift. Wäre dies der Fall, hätte es zu einer Verminde-

¹ F. H. GOLDBERG and E. REICH, Fedn Proc. Fedn Am. Soc. exp. Biol. 20, 958 (1964).

² O. v. DEIMLING und H. NOLTENIUS, Histochemistry 3, 500 (1964).

³ A. E. G. PEARSE, *Histochemistry*, 2nd edn (Churchill Ltd., London 1960).

⁴ O. v. DEIMLING, Histochemistry 4, 48 (1964).

⁵ T. BARKA and P. J. ANDERSON, *Histochemistry* (Harper and Row, Inc. 1963).

rung^{6,7} und nicht zu einer Verstärkung der Fermentaktivität kommen müssen. Es ist daher anzunehmen, dass die Aktivität der Phosphatasen indirekt gesteuert wird, vermutlich durch ein Repressorsystem, dessen Ausschaltung durch Actinomycin die Fermentaktivität ansteigen lässt. Offen bleiben muss jedoch, ob Actinomycin unmittelbar die Wirkung des Repressorgens auf das Struktur- bzw. Operatorgen beeinträchtigt – in diesem Fall würde es zu einer vermehrten Neubildung von Phosphatasen kommen – oder ob, wie es Moog für das Duodenum annimmt⁸, die Bildung eines Proteins unterbunden wird, das im Cytoplasma die Umwandlung von inaktiven Phosphatasemolekülen in aktive hemmt. Vielleicht spielen auch beide Mechanismen eine Rolle. Auffällig ist die Ähnlichkeit unserer Ergebnisse mit denen von SCHIEBLER und MÜHLENFELD⁹, die durch Gaben von Östrogen eine geschlechtsspezifische Steigerung der Aktivität von alkalischer und saurer Phosphatase in der Zona subcorticalis der Niere unreifer Ratten ab 12. Lebenstag erzielen konnten. Die Wirkung von Actinomycin ist jedoch geringer als die von Östrogen. Nach unseren gegenwärtigen Kenntnissen greift auch das Östrogen in das Repressorsystem ein¹⁰. Zu überlegen ist, ob ein Teil der Actinomycinwirkung auf eine Stimulierung der Nebennierenrinde zurückzuführen ist. Eine endgültige Klärung dieser Frage steht noch aus. Vorversuche haben jedoch ergeben, dass durch Cortison bei Tieren zwischen dem 12. und 15. Lebenstag zwar eine begrenzte allgemeine Steigerung der

Aktivität von alkalischer und saurer Nierenphosphatase eintritt, aber nicht das geschlechtsspezifische Enzymmuster erzeugt werden kann. Unklar bleibt schliesslich, warum die Actinomycinwirkung in erster Linie die Zona subcorticalis betrifft. Dies dürfte jedoch nicht von prinzipieller Bedeutung sein, da auch während der normalen Entwicklung diese Zone eine besondere Aktivitätssteigerung erfährt.

Summary. Actinomycin D causes a marked increase of alkaline phosphatase activity in the zona subcorticalis of the developing rat kidney. The effect is more pronounced in female than in male animals. Acid phosphatase activity increases in males only.

T. H. SCHIEBLER und CH. PILGRIM

Anatomisches Institut der Universität Würzburg
(Deutschland), 1. September 1967.

⁶ F. Moog, *Science* 144, 414 (1964).

⁷ F. Moog, *Adv. Enzyme Regulat.* 3, 221 (1965).

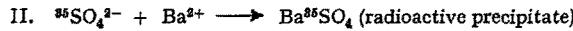
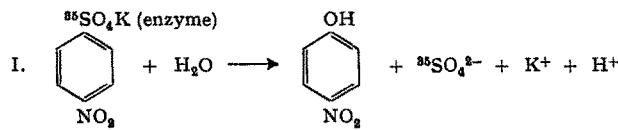
⁸ F. Moog, *J. exp. Zool.* 161, 353 (1966).

⁹ T. H. SCHIEBLER und E. MÜHLENFELD, *Naturwissenschaften* 53, 311 (1966).

¹⁰ O. HECHTER and J. D. HALKERSTON A. *Rev. Physiol.* 27, 133 (1965).

Autoradiographic Demonstration of Arylsulphatase C Activity in Peritoneal Mast Cells of the Rat

Mast cells take up intensively labelled sulphate^{1,2}. This is considered to be a reflection of sulphation or perhaps of synthesis of heparin³. On the other hand, tissues which rapidly metabolize sulphate are known to indicate a high arylsulphatase activity. Experiments were, therefore, carried out to demonstrate activity of this enzyme in mast cells of rat peritoneal fluid. Relative, quantitative autoradiography was used in order to find the difference in arylsulphatase C activity in mast cells of young and adult rats. Of the 3 arylsulphatasen A, B, and C⁴, only the latter can be reliably demonstrated by cytochemical methods owing to its desmo-enzymatic character. For revealing arylsulphatase C in mast cells, the previously described method⁵ was used. The principle of this method may be presented as follows:



The cells are incubated with the substrate, labelled *p*-nitrophenol potassium sulphate, in the presence of Ba ions. Arylsulphatase hydrolyzes the substrate to labelled sulphate (I) which reacting with Ba ions yields a precipitate of labelled BaSO_4 (II). Such a precipitate may be detected autoradiographically.

Method. Two groups of Wistar female 7-day- and 1-year-old rats were used. The peritoneal cells were collected separately from the animals of both age groups. Smears were prepared and fixed in 10% neutralized formalin at 4°C. The cells were then subjected to the following procedure. (a) Preincubation in $2.5 \times 10^{-3} M$ barium acetate for 5 min at 37°C; this aimed at creating conditions of better saturation of the cells with the capturing agent. (b) Incubation in $5.0 \times 10^{-3} M$ *p*-nitrophenol potassium ^35S -sulphate⁶, specific activity 0.65mC/mM for 1 h at 37°C. (c) Washing in $2.5 \times 10^{-3} M$ of 'cold' *p*-nitrophenol potassium sulphate. All ingredients used in the reaction described above were dissolved in 0.05M hydroxymethyl aminomethane (*Tris*) buffer, pH 7.51. Some smears were heated at 100°C and then the reaction for arylsulphatase C was carried out as a negative control. All smears were autoradiographed with Kodak AR 10 film and the autoradiographs were stained with toluidine blue. The percentage of labelled cells, as well as the mean grain counts/mast cell, were calculated.

Results. Autoradiographs of the smears heated at 100°C did not indicate any radioactivity in the cells. However,

¹ G. G. GUIDOTTI and F. SPINELLI-RESSI, *Expl Cell Res.* 33, 254 (1964).

² W. SAWICKI, *Bull. Ac. Pol. Sci. Cl. II Sér. Sci. biol.* 12, 599 (1964).

³ E. D. KORN, *J. biol. Chem.* 234, 1647 (1959).

⁴ A. B. ROY, *Biochem. J.* 53, 12 (1953).

⁵ J. KAWIAK, W. SAWICKI and B. MIKS, *Acta histochem.* 19, 184 (1964).

⁶ The supply of which by Dr. J. KAWIAK is here gratefully acknowledged.