

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 Regulative* 3, 221 (1965).

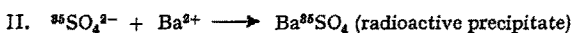
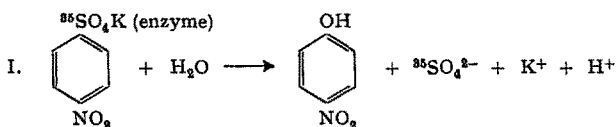
⁸ F. Moog, *J. exp. Zool.* 161, 353 (1966).

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 arylsulphatases 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 BaSO₄ (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 × 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 × 10⁻³ M *p*-nitrophenol potassium ³⁵S-sulphate⁶, specific activity 0.65 mCi/mM for 1 h at 37°C. (c) Washing in 2.5 × 10⁻³ M of 'cold' *p*-nitrophenol potassium sulphate. All ingredients used in the reaction described above were dissolved in 0.05 M 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).

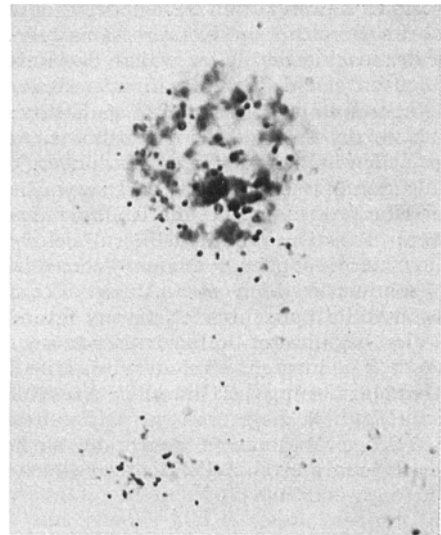
⁶ The supply of which by Dr. J. KAWIAK is here gratefully acknowledged.

in the autoradiographs of experimental (intact) smears, the label was present in the majority of mast cells (Figure). The frequency distribution of grain counts and the mean number of grains/mast cell are presented in the Table. The number of grains/cell varies, but not significantly, between the mast cells within the same age group. The differences between the grain counts of the mast cells from animals of 2 age groups are significant ($p < 0.05$). About 32% of mast cells of 7-day-old rats did not indicate any or only slight activity of arylsulphatase C, which cannot be detected autoradiographically. The percentage of non-radioactive mast cells from 1-year-old rats was about 19%.

The kind and concentrations of the substrate used and its pH show that the enzyme detected in the present study is arylsulphatase C. It may therefore be concluded that mast cells of rat peritoneal fluid contain active arylsulphatase C, and that the activity of this enzyme is higher in adult than in young rats.

Distribution of grains/mast cell of rats in 2 age groups

Grains/mast cell	Distribution of grains in %	
	7-day-old	1-year-old
0-4	32.1	19.7
5-10	22.8	10.8
11-15	13.4	18.3
16-20	19.3	25.5
21-25	9.4	11.6
26-30	3.0	8.7
≥ 31	0	5.4
Total:	100.0%	100.0%
Mean grain count/mast cell ± S.E.	12.1 ± 0.59	21.7 ± 0.98



Résumé. En utilisant la méthode autoradiographique avec du *p*-nitrophénol potassium ^{35}S -sulphate comme substratum, on constate que l'arylsulphatase C se trouve dans les mastocytes. Dans la majorité des mastocytes qui sont dans le liquide péritonéal du rat, on constate la présence d'arylsulphatase C active. L'activité de cet enzyme est 2 fois plus forte dans les mastocytes des animaux âgés d'un an que dans les cellules des animaux de 7 jours.

W. SAWICKI

Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Warszawa (Poland), 16th May 1967.

DNS-Synthese der Neuroglia im experimentellen Hirnödeme

Es wurde autoradiographisch untersucht, ob die für verschiedene Hirnödeme beschriebene progressive Umwandlung der Gliazellen^{1,2} mit einer echten Zellproliferation einhergeht. Ausgangspunkt der Versuche war die Beobachtung vereinzelter Mitosen der Neuroglia in den subakuten Stadien eines experimentellen Hirnödems nach epiduraler Kompression³. Um Ausmass und Lokalisation dieser Zellteilungsvorgänge besser beurteilen zu können, wurde intravital ein spezifischer DNS-Vorläufer, H^3 -Thymidin, appliziert.

Methode. Erwachsenen Katzen wurde in Nembutal-Narkose ein linsengrosses Laminariastück in den Extraduralraum über der rechten Grosshirnhemisphäre eingesetzt. In zeitlichen Abständen von 1, 2 und $3\frac{1}{2}$ Tagen nach der Operation wurde Thymidin- H^3 (2 mC/kg, spezifische Aktivität 3000 mC/mM) i.v. injiziert. Die Applikation erfolgte bei allen Tieren um 10 Uhr, jeweils 1 h vor dem Tode. Von 4 μ dicken Schnitten der Katzegehirne

wurden Autoradiogramme hergestellt (Stripping-Film AR 10 Kodak, London; flüssige Emulsion G 5 Ilford, London). Zur Auswertung wurden die Autoradiogramme bei 1000facher Vergrösserung systematisch in einem Zeilenabstand von 0,5 mm durchgesehen. Die Lokalisation der H^3 -markierten Gliazellen (ausgenommen Mikroglia) wurde in eine maßstabsgerechte Zeichnung übertragen (s. Figur 1).

Ergebnisse. Die aus der Quellung der Laminaria (8- bis 10fache Volumenzunahme innerhalb von 24 h) resultierende Hirnkompression führte zu ausgedehnten Ödemveränderungen in der homolateralen Hemisphäre. Die Auswertung der Autoradiogramme ergab eine Inkorpora-

¹ L. BAKAY und J. C. LEE, *Cerebral Edema* (Ch. C. Thomas, Springfield, Ill. 1965).

² K. J. ZÜLCH, *Dt. Z. NervHeilk.* 170, 179 (1953).

³ E. RIVEROSON, P. KLEIHUES, B. SCHULTZE und W. WECHSLER, *Verh. dt. Ges. Path.* (G. Fischer, Stuttgart 1966), p. 441.