

the drug (200 mg/kg) was administered 0.5–2.5 h after irradiation; injections at 24 and 72 h after X-ray exposure gave a survival of  $46 \pm 4.6\%$  and  $30 \pm 2.3\%$  respectively.

Both the very low redox potential of reduced DTT, and the high concentration of peroxy radicals in biological fluids during irradiation, make it hard to see how the

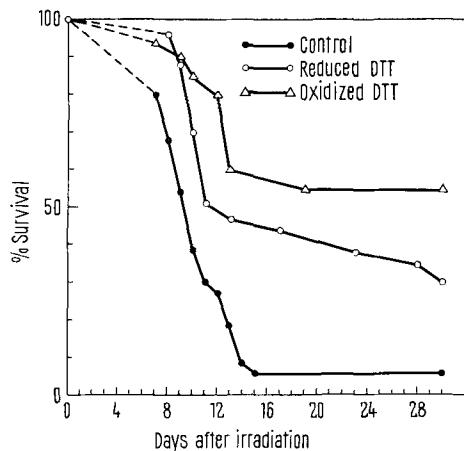


Fig. 1. Effect of reduced and oxidized dithiothreitol on the survival rate of irradiated mice. Data were obtained on groups of 50 animals given an X-ray dose of 625 R.

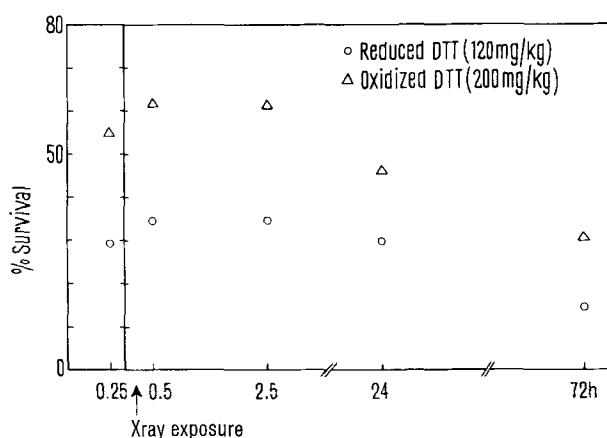


Fig. 2. Percentage of survival at 30 days in mice treated with reduced and oxidized dithiothreitol at different times before and after irradiation with 625 R. Each experimental point is the average of 50 animals.

effect ascribed to the higher dose of oxidized DTT may be due to its conversion in the reduced form.

In fact, when in separate experiments aqueous solutions of reduced DTT at a concentration of 3 mg/ml were exposed to a dose of 625 R in conditions identical to those used in the animal experiments, almost 90% of the compound, as shown by the increase in absorbancy at 268 nm, was converted to the oxidized form. On the other hand, no change in absorbancy was observed in control experiments using oxidized DTT at a concentration of 5 mg/ml.

**Discussion.** We may therefore summarize the 3 major features of the effect of DTT on irradiated mice as follows: (1) the reduced form is able to bring about recovery from X-ray damage with the same effectiveness up to 24 h after irradiation, an effect which seems to be unique among sulphhydryl compounds; (2) the oxidized form shows an appreciable radioprotection and recovery effect up to 72 h after exposure; (3) the oxidized form, used at a concentration twice as high as that of the reduced one, has greater effect (60%) on survival than reduced DTT (30%), in both protection and recovery experiments.

It has recently been reported that chromosomal aberrations in leucocyte cultures exposed to an X-ray dose of 200 R are decreased if the cultures are pretreated with 1–4 dithiothreitol<sup>6</sup>. The results obtained with reduced DTT in whole animals show a fair correlation with these obtained in vitro. MAISIN et al.<sup>7</sup> have shown that yeast RNA hydrolysate is able to recover mice from X-ray exposure, but the mechanism of the action of such effect is not yet fully understood.

The chemical structure of DTT does not resemble a nucleotide and in order to explain its effects as a recovery factor, some other mechanism should be invoked. Probably DTT acts as inducer molecule for repairing processes in irradiated cells.

**Résumé.** Le DTT réduit et oxydé, administré à des souris irradiées par des doses mortelles de rayons X, provoque une survie notable; le meilleur effet est obtenu avec le DTT oxydé, administré indifféremment avant ou après l'irradiation.

C. FALCONI, P. SCOTTO  
and P. DE FRANCISCIS

*Il Cattedra di Fisiologia Umana,  
Università di Napoli,  
I-80138 Napoli (Italy), 17 June 1969.*

<sup>6</sup> Y. A. E. BICK and W. D. JACKSON, Nature 217, 479 (1968).

<sup>7</sup> J. MAISIN, P. DUMONT and A. DUNIC, Nature 186, 487 (1960).

## Unterschiede der ATPase-Hemmung durch Azid in weissen und roten Muskelfasern der Ratte

Man unterscheidet in der quergestreiften Skelettmuskulatur zwischen weissen und roten Fasern. Bei manchen Tierarten gibt es ganze Muskeln, die entweder weisse oder rote Fasern enthalten, wie zum Beispiel beim Kaninchen oder Huhn. Bei anderen Tierarten sind in verschiedenen Muskeln weisse und rote Fasern mehr oder weniger vermischt vorhanden. Bei der Ratte kann man in verschiedenen Muskeln weisse und rote Teile voneinander trennen. Weisse und rote Muskelfasern unterscheiden sich in ihren mechanischen, elektrischen und biochemi-

schen Reaktionen in verschiedener Art. In den roten Fasern ist ein mehrfach höherer Gehalt an Mitochondrien vorhanden als in den weissen Fasern (PADYKULA und GAUTHIER<sup>1</sup>). Es lässt sich daraus folgern, dass an Mito-

<sup>1</sup> H. A. PADYKULA and G. F. GAUTHIER, in *Exploratory Concepts in Muscular Dystrophy and Related Disorders* (Ed. A. T. MILHORAT; Excerpta medica foundation, International congress series, Elsevier, Amsterdam 1966), Nr. 147, p. 117.

chondrien gebundene Stoffwechselprozesse in diesen beiden Fasertypen verschieden ablaufen. Im folgenden wird untersucht, ob die durch Magnesium aktivierte ATPase in Gegenwart von EGTA – welches Kalzium cheliert – bei roten und weißen Fasern durch Azid verschieden gehemmt wird.

Nach von BROCKE und RÜEGG<sup>2</sup> wird einem Homogenat von Insektomyofibrillen etwa die Hälfte der totalen Aktivität der Magnesium-aktivierten ATPase durch eine in den Mitochondrien lokalisierten ATPase bestimmt, wenn das System in kalziumfreier Form vorliegt.

*Material und Methode.* Bei 4–6 Monate alten Wistar-Ratten wurden verschiedene Teile von weißen und roten Muskeln aus der Becken- und Oberschenkelregion präpariert. Zum Vergleich wurden der rote M. soleus und der weiße M. gastrocnemius aus der Unterschenkel-muskulatur verwendet. Alle Präparationen wurden in der Kühlkammer bei  $\pm 2^\circ\text{C}$  vorgenommen.

Die Muskelstücke von 0,5–1,0 g wurden in der zehnfachen Menge Borat-Puffer ( $39 \text{ mM H}_3\text{BO}_3 + 25 \text{ mM KCl}$ ) mit dem Virtis-Homogenisator während 2 min homogenisiert. Diese Suspension, welche die Proteine der Myofibrillen enthält, wurde innerhalb der nächsten 2 Stunden auf die Aktivität der Mg-ATPase untersucht. Hierzu wurde nochmals zehnmal verdünnt, und es wurden

#### Hemmung der Mg-ATPase in Muskelhomogenaten durch Azid

Muskelfasern	ATPase ungehemmt (kein Azid)	ATPase gehemmt (10 mM Azid)	Hemmung %	Fasertyp
M. rectus femoris; zentraler Teil	37.0	19.2	48	rot
M. vastus lateralis	40.1	18.9	53	rot
M. vastus intermedius	36.3	15.3	58	rot
M. glutaeus max.; zentraler Teil	35.8	16.4	54	rot
M. piriformis	32.6	13.0	60	rot
M. soleus	31.4	14.8	53	rot
M. rectus femoris; peripherer Teil	36.4	31.0	12	weiss
M. vastus medialis	48.0	43.6	9	weiss
M. glutaeus max.; peripherer Teil	44.8	40.7	9	weiss
M. glutaeus medius	39.3	34.9	11	weiss
M. gastrocnemius	41.5	36.5	12	weiss

Die Aktivität ist ausgedrückt in  $\mu\text{g}$  anorganischem Phosphor, freigesetzt pro ml Homogenat in 5 min Inkubation bei  $25^\circ\text{C}$  ( $\mu\text{g P}_i/\text{ml Homogenat}/5 \text{ min } 25^\circ\text{C}$ ).

0,2 bis 0,5 ml für die Messungen der ATPase genommen. Das entspricht 0,2–0,8 mg Protein.

Die Homogenatsproben wurden in eine Lösung pipettiert, welche  $2,5 \text{ mM MgCl}_2$ ,  $0,5 \text{ mM EGTA}$  und  $25 \text{ mM HCl Tris-Puffer}$  enthielt. Vor der Inkubation wurde mit Wasser auf 2,0 ml aufgefüllt<sup>3</sup>. Von jedem Homogenat wurden 2 Proben mit Zusatz von je 0,1 ml  $100 \text{ mM Azid}$  und 2 Proben ohne Azid inkubiert. Nach 5 min Inkubation bei  $25^\circ\text{C}$  wurde die Reaktion durch Hinzusetzen von 0,1 ml  $50 \text{ mM ATP}$  gestartet und nach genau 5 min mit 1 ml 25% Trichloressigsäure abgestoppt. Der Zusatz von ATP führt zur Spaltung des ATP, wobei anorganischer Phosphor ( $P_i$ ) frei wird. Die Hemmung der ATPase-Aktivität durch Azid wurde mit der ATPase-Aktivität der Probe ohne Azid desselben Homogenates verglichen. Es wurde die relative Aktivität der ATPase bestimmt ( $\mu\text{g P}_i/\text{ml Homogenat in 5 min bei } 25^\circ\text{C}$ ). Die Bestimmung des bei der Reaktion freigesetzten Phosphors wurde nach der Methode von FISKE und SUBBAROW<sup>4</sup> ausgeführt.

*Resultate.* In der Tabelle sind die untersuchten Muskeln zusammengestellt und ihr Verhalten aufgrund des Azid-Testes angegeben. Dabei zeigt sich, dass die Mg-ATPase der roten Muskeln stark und diejenige der weißen Muskeln nur schwach gehemmt wird. Der Vergleich mit dem typisch weißen M. gastrocnemius und roten M. soleus beweist dies.

Es ist demnach möglich, mit diesem Test weiße und rote Muskelfasern deutlich voneinander zu unterscheiden, auch wenn die präparativ festgestellte Farbe der Muskelfasern unsicher ist<sup>5</sup>.

*Summary.* With a simple test – inhibition of the Mg-activated ATPase in a total homogenate of muscle by azide – it is possible to distinguish clearly between red and white muscle fibres. A number of muscles of the pelvic and thigh region of the rat are investigated by this method.

M. ERMINI

Institut für experimentelle Gerontologie,  
Nonnenweg 7,  
Basel (Schweiz), 3. Oktober 1969.

<sup>2</sup> H. H. von BROCKE und J. C. RÜEGG, Helv. physiol. Acta 23, 79 (1965).

<sup>3</sup> EGTA, Äthylen-glykol-bis-(2-aminoäthyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (Fluka, Buchs). HCl-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck) mit HCl auf pH 7,6 eingestellt.  $P_i$ , anorganischer Phosphor. Azid,  $\text{NaN}_3$  (Fluka, Buchs). ATP, Adenosin-5'-triphosphorsäure (Fluka, Buchs).

<sup>4</sup> C. FISKE und Y. SUBBAROW, J. biol. Chem. 66, 375 (1925).

<sup>5</sup> Diese Arbeit wurde durch die Roche-Studien-Stiftung ermöglicht, welcher ich hier meinen Dank ausspreche.

#### Morphometrische Untersuchungen an der Rattenleber - Parenchymzelle nach Anwendung verschiedener Fixationspuffer

Die Einführung morphometrischer Methoden in die Elektronenmikroskopie gestattet es, auf relativ einfache und zeitlich wenig aufwendige Art und Weise zu quantitativen Aussagen über die Volumen- beziehungsweise Membranoberflächenanteile der verschiedenen Zellorganellen zu gelangen. Besonders bei der Erfassung von ultrastrukturellen Veränderungen unter mannigfachen experimentellen Versuchsbedingungen gewinnt die Morphometrie zunehmend an Bedeutung.

Bisher liegt eine Vielzahl von experimentellen Arbeiten über das glatte endoplasmatische Retikulum der Leber unter verschiedenen physiologischen, als auch pathologischen Bedingungen vor<sup>1</sup>. Dabei lässt dieses Zellkompartiment eine enge topographische Beziehung sowohl zu den

<sup>1</sup> H. DAVID, Elektronenmikroskopische Organpathologie (VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1967).