

Relative Phase Difference as an Index of the Quantity of the Secretory Material in the Neurosecretory Cell of *Iphita limbata*

In an attempt to devise a quantitative method to estimate the neurosecretory material in the cell, the refractive index of the cytoplasm of the ordinary neurone and of the neurosecretory cell was studied using BARER's¹ double-immersion method. The brain of the plant bug *Iphita limbata* Stal. was processed as outlined in an earlier work². Phase measurements on the cytoplasm of the neurosecretory cells of pars intercerebralis and that of the adjacent ordinary neurones were taken when the sections were immersed in liquid paraffin which was successively displaced thoroughly by xylol and methyl salicylate by the irrigation technique³. Phase measurements of the same cells along the same region were taken when the cells were immersed in methyl salicylate. An AO Baker interference microscope with $\times 40$ shearing system and a tungsten lamp with green filter were used for the present study. Measurements were taken only where there was no overlap of the images. Refractive indices of the immersion media were found by means of an Abbe refractometer. Refractive index of the neurosecretory cell and of the ordinary neurone was calculated⁴. It was found that the refractive index of the fixed and dehydrated neurosecretory cell was 1.568 ± 0.017 and that of the ordinary neurone, 1.567 ± 0.013 , which were not significantly different from one another. These findings are in good agreement with those of BARER and JOSEPH⁵ for the refractive index of pure protein (1.58).

Though these findings revealed that in fixed and dehydrated sections neurosecretory cells and ordinary neurones had identical refractive indices, the neurosecretory cells showed higher phase retardation than the ordinary neurones in similar preparations². As the optical path is the product of thickness and refractive index, the concentration of dry matter in the neurosecretory cell and the ordinary neurone is presumably expressed in thickness of these cells when fixed and dehydrated. So the relative phase difference of the neurosecretory cell in tissue sections, which may be considered as the ratio of phase retardation of the neurosecretory cell divided by phase re-

tardation of ordinary neurone in the same section and in the same medium, should represent correctly the ratio of their concentration of dry matter during live condition. The fact that the relative phase retardation of the neurosecretory cell is identical in liquid paraffin (2.028 ± 0.405) and in methyl salicylate (2.027 ± 0.497) within the limits of experimental error, supports this view.

This hypothesis was further evaluated in the following study. Brains of female *Iphita* in the nearly gravid condition when the neurosecretory cells were full, as well as of animals which just started oviposition when the cells were depleted⁶, were dissected out, processed and phase measurements in liquid paraffin taken as described above. In all cases, phase retardation value of the individual neurosecretory cell in each brain section was divided by the phase retardation value of an adjacent ordinary neurone in the same brain section, and its relative phase retardation calculated. Measurements were taken on all neurosecretory cells whose thickness as judged visually was not less than the thickness of the section. The findings are summarized in the Table. It may be seen that the relative phase retardation of the neurosecretory cell of the animals after oviposition was only 1.753 ± 0.385 , which is considerably lower than the value for neurosecretory cells from females before oviposition (2.028 ± 0.478).

Slides were subsequently stained by GOMORI's⁷ method and the observations⁶ confirmed. It is concluded that the relative phase retardation of the neurosecretory cell defined as phase retardation of the neurosecretory cell relative to that of the ordinary neurone may be taken as an index of the quantity of the secretory material in the cell⁸.

Zusammenfassung. Die sogenannte Phasenverzögerung in neurosekretorischen Zellen beim weiblichen Käfer *Iphita limbata* vor und nach der Eiabsonderung ist verschieden und wird als Index für die Quantität der neurosekretorischen Substanz betrachtet.

V. K. K. PRABHU and K. K. NAYAR

Department of Zoology, University of Kerala,
Kariavattom, Trivandrum (India), 22 September 1969.

Relative phase retardation of the neurosecretory cells when mounted in liquid paraffin, in nearly gravid *Iphita* and in those which have started oviposition

	Animal almost gravid	Started oviposition
Animals	4	4
Brain sections	113	108
Neurosecretory cell sections	260	264
Neurones	132	108
Relative phase retardation in liquid paraffin (mean $\pm$ S.D.)	2.028 ± 0.478	1.753 ± 0.385

¹ R. BARER, Nature 172, 1098 (1953).

² V. K. K. PRABHU, Proc. Sem. Int. Cell Biology, Bombay (1966), p. 428.

³ R. BARER and S. JOSEPH, Q. J. microsc. Sci. 96, 423 (1955).

⁴ R. BARER and D. A. T. DICK, Expl. Cell Res., Suppl. 4, 103 (1957).

⁵ R. BARER and S. JOSEPH, Q. J. microsc. Sci. 95, 399 (1954).

⁶ K. K. NAYAR, Proc. Ind. Acad. Sci., B. 47, 233 (1958).

⁷ G. GOMORI, Am. J. Path. 17, 395 (1941).

⁸ This work was supported by a generous grant from the Ford Foundation.

Hemmung von SH-Enzymen durch Ethacrynsäure

DUGGAN und NOLL¹ machen die Blockierung essentieller SH-Gruppen für die Wirkung von Ethacrynsäure (2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)phenoxyessigsäure) verantwortlich. Die Hemmung gewisser Energieübertragungsprozesse in Mitochondrien²⁻⁴ kann ebenfalls auf

diese Weise gedeutet werden; höchstwahrscheinlich ist ja eine SH-Gruppe an einem Zentrum, das zwischen Atmungskette und dem Oligomycinangriffspunkt liegt für die Energiekonservierung von ausschlaggebender Bedeutung⁵⁻⁷.

Hemmung verschiedener SH-Enzyme durch Ethacrynsäure

Ethacrynsäure-Konzentration (M)	Succinatdehydrogenase		Prolinoxidase		Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase		Lipoamiddehydrogenase	
	E	% Hemmung	E	% Hemmung	E	% Hemmung	E	% Hemmung
—	0,0085	—	0,0209	—	0,318	—	0,055	—
$7,5 \cdot 10^{-5}$	0,0078	8,2	0,0196	6,2	0,182	42,8	—	—
$7,5 \cdot 10^{-4}$	0,0072	15,3	0,0091	56,5	0,046	85,5	—	—
$7,5 \cdot 10^{-3}$	0,0042	50,6	0,0007	96,7	0,027	91,5	0,032	41,8

Inkubationsbedingungen. Mitochondrienextrakt wurde mit einem gleich grossen Volumen wässriger Ethacrynsäurelösung (pH 8,5) entsprechender Konzentration gemischt, 20 Min lang bei 0°C gehalten und anschliessend gemessen. Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase wurde mit 0,1 M Triäthanolamin-HCl (pH 7,6) entsprechend verdünnt und wie oben mit wässriger Ethacrynsäurelösung inkubiert.

Kontrollen. Mitochondrienextrakt beziehungsweise Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenaselösung wurde mit 1% wässriger Natriumbicarbonatlösung (pH 8,5) inkubiert.

Neben der Beeinflussung von Energieübertragungsreaktionen könnte auch die direkte Hemmung von SH-Enzymen durch Ethacrynsäure für die Erklärung der pharmakologischen Wirkung von Bedeutung sein. Es schien uns daher von Interesse, den Wirkungsmechanismus von Ethacrynsäure durch Untersuchung der Beeinflussung einfacher SH-abhängiger Dehydrogenasen zu belegen. Wir haben für die vorliegende Untersuchung 2 SH-abhängige, eng mit der Atmungskette verbundene Dehydrogenasen (Succinatdehydrogenase, Prolinoxidase), eine Dehydrogenase, die für den Substratkettenphosphorylierungsschritt im Embden-Meyerhof-Weg verantwortlich ist (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) und schliesslich die Lipoamiddehydrogenase, die mit der oxydativen Decarboxylierung verknüpft ist, herangezogen.

Methoden. Succinatdehydrogenase, Prolin- und Hydroxyprolinoxidase sowie Lipoamiddehydrogenase wurden in nicht phosphorylierenden, mit Hilfe von Triton X-100 hergestellten Extrakten aus Rattenlebermitochondrien untersucht⁸. Die Bestimmung der 3 erstgenannten Enzyme erfolgte mittels 2-(p-Jodphenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT) als Elektronenakzeptor⁸. Die Lipoamiddehydrogenase wurde nach MASSEY und VEEGER⁹ mit Liponsäure als Akzeptor bestimmt. Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel stammte von Boehringer, Mannheim und wurde nach BÜCHER et al.¹⁰ bestimmt. Unter 1 Einheit (E) der betreffenden Enzyme wird stets jene Menge verstanden, die unter den jeweils angegebenen Bedingungen pro Minute 1 μ Mol Substrat umsetzt. Wässrige Ethacrynsäurelösungen wurden stets frisch hergestellt: Ethacrynsäure wurde in 1% Natriumbicarbonat suspendiert und durch Zusatz von 0,1 N NaOH völlig in Lösung gebracht (pH 8,5).

Ergebnisse und Diskussion. Wie in der Tabelle dargestellt, findet sich für alle untersuchten Enzyme eine konzentrationsabhängige Hemmung durch Ethacrynsäure. Die Hemmwirkung ist im Falle der Succinatdehydrogenase und der Lipoamiddehydrogenase bei gleichen Konzentrationen deutlich geringer als für die Prolinoxidase und die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase.

Wir haben ferner festgestellt, dass auch die Hydroxyprolinoxidase durch Ethacrynsäure gehemmt wird und zwar bei entsprechenden Konzentrationen sogar stärker als die Prolinoxidase (20, 70 und 98%). Während für die Prolinoxidase bekannt ist, dass es sich um ein SH-Enzym handelt¹¹, ist dies allerdings für die Hydroxyprolinoxidase noch nicht bewiesen.

Vergleicht man die für die Hemmung der SH-Enzyme erforderlichen Konzentrationen an Ethacrynsäure mit

jenen, die für die Hemmung mitochondrialer Energieübertragungsreaktionen notwendig sind^{2,3}, so ergibt sich ein durchschnittlich etwas geringerer, grössenordnungsmässig aber vergleichbarer Hemmeffekt für die untersuchten Enzyme. Unsere Befunde bestätigen damit, dass Ethacrynsäure mit SH-Enzymen reagieren kann¹. Ferner geben unsere Versuche einen Hinweis für die Annahme, dass Ethacrynsäure nicht nur in die mitochondriale Energieübertragung eingreift, sondern auch eine wesentlich allgemeinere Beeinflussung kataboler Prozesse bewirken kann. Möglicherweise kann man die von GAUDEMER und FOUCHER² auch in entkoppelten Mitochondrien gefundene Hemmung der Succinatoyxidation durch Ethacrynsäure als direkte Hemmung der Succinatdehydrogenase deuten¹².

Summary. Enzymes with essential SH-groups (succinate dehydrogenase, proline oxidase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) are inhibited by ethacrynic acid. The concentrations needed are comparable with those known to inhibit energy-linked reactions in mitochondria. It is suggested that the action of ethacrynic acid is not only due to its influence on mitochondrial energy conserving reactions.

R. KRAMAR und E. KAISER

Institut für Medizinische Chemie der Universität, A-1090 Wien (Österreich), 24. November 1969.

¹ D. E. DUGGAN und R. M. NOLL, Arch. Biochem. Biophys. 109, 388 (1965).

² Y. GAUDEMER und B. FOUCHER, Biochim. biophys. Acta 131, 255 (1967).

³ R. KRAMAR und E. KAISER, Experientia 24, 906 (1968).

⁴ B. FOUCHER, A. GEYSSANT, D. GOLDSCHMIDT und Y. GAUDEMER, Europ. J. Biochem. 9, 63 (1969).

⁵ A. L. FLUHARTY und D. R. SANADI, Biochemistry 2, 519 (1963).

⁶ A. FONYO und S. P. BESSMAN, Biochem. biophys. Res. Commun. 24, 61 (1966).

⁷ K. W. LAM, Arch. Biochem. Biophys. 123, 642 (1968).

⁸ R. KRAMAR, Enzymologia 33, 33 (1967).

⁹ V. MASSEY und C. VEEGER, Biochim. biophys. Acta 48, 33 (1961).

¹⁰ G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER, Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953).

¹¹ K. LANG und H. LANG, Biochem. Z. 329, 577 (1958).

¹² Für die Überlassung von Ethacrynsäure sind wir der Fa. Contex (Wien) zu grossem Dank verpflichtet.