

Fig. 2. Effect of bilateral stimulation of the sympathetic trunc at LG_1 - LG_2 (rectangular impulses of 5 msec duration, amplitude 6.2 V and frequency 15 imp/sec) whilst blood pressure artificially stabilized on radius, wall thickness and tension of the abdominal aorta.

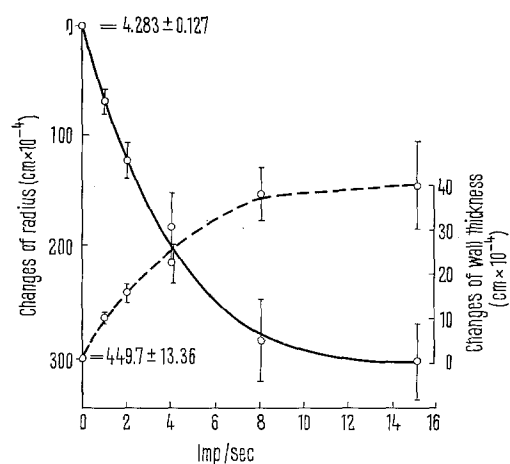


Fig. 3. Changes (mean values \pm S.E.M. of 21 series of stimulations) of the radius (full line, scale left) and wall thickness (interrupted line, scale right) of the aorta plotted to the frequency of bilateral sympathetic stimulation. Numerals relative to zero frequency = the respective resting values before stimulation.

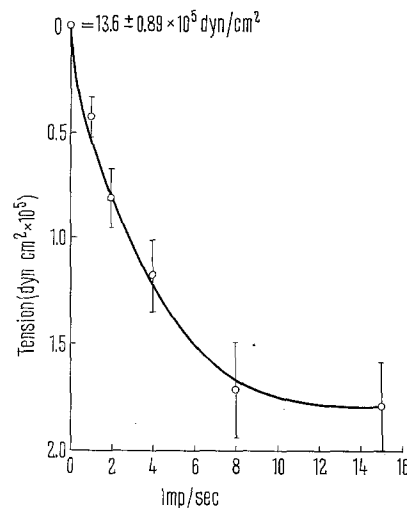


Fig. 4. Changes of the tension of the aorta (mean values \pm S.E.M. of 21 series of stimulations) plotted to the frequency of bilateral sympathetic stimulation. Numerals relative to zero frequency = the respective resting value before stimulation.

sec stimulation frequency, maximal constriction being attained at 15 imp/sec. The wall thickness, on the other hand, is simultaneously increasing (Figure 3). Consequently, changes in tension due to smooth muscle contraction are shown to be frequency dependent also (Figure 4), tension being indirectly related to the stimulation frequency.

Conclusions. The diameter and blood pressure of the abdominal aorta were monitored directly and wall thickness and tension were calculated both at steady state and sympathetic stimulation. The blood pressure being stabilized, sympathetic stimulation (LG_1 - LG_2 level) elicited a decrease of radius associated with wall thickening and with a decrease of the wall tension; all of the above parameters being frequency dependent. If during sympathetic stimulation the blood pressure increased, an increase of tension occurred.

Zusammenfassung. Blutdruck und Durchmesser der Aorta abdominalis wurden in vivo bei Ruhe und während Sympathikusreizung zur Berechnung der Wandstärke und -Spannung direkt registriert.

M. GEROVÁ and J. GERO

*Institute of Normal and Pathological Physiology,
Slovak Academy of Sciences, Sienkiewiczova 1,
Bratislava (Czechoslovakia), 11 June 1970.*

Untersuchungen zur Klärung der Funktion des Reissnerschen Fadens. In-vitro-Bindung von Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin

Das Subcommissuralorgan (SCO) des Wirbeltiergehirns sezerniert ein Glykoprotein, das als Reissnerscher Faden (RF) Ventrikelräume und Zentralkanal des Rückenmarkes bis zu dessen kaudalen Ende durchwächst¹⁻³.

In der Untersuchungsgeschichte des SCO-RF-Komplexes ist mehrfach die Ansicht vorgetragen worden, dass das von den Drüsenzellen in den Ventrikel entlassene Sekret Liquorkomponenten bindet und etwa als Detoxi-

kator² oder hirneigenes Exkretionssystem¹ Substanzen eliminiert, die die normale Tätigkeit des umgebenden

¹ G. STERBA, in *Zirkumventrikuläre Organe und Liquor*. Symposiumsbericht (G. Sterba, Jena 1969).

² R. OLSSON, *Acta zool.*, Stockh. 39, 71 (1958).

³ A. ERMISCH, G. STERBA, A. MUELLER und J. HESS, *Acta zool.*, Stockh., im Druck (1970).

¹⁴ C-Amine	¹⁴ C-Aminbindung											
	I × 10 ⁻⁴	RF × 10 ⁻¹⁰	R	I × 10 ⁻⁵	RF × 10 ⁻¹⁰	R	I × 10 ⁻⁷	RF × 10 ⁻¹⁰	R	I × 10 ⁻⁸	RF × 10 ⁻¹⁰	R
Serotonin				3,5	1,4	0,0	3,6	0,09	0,5			
Noradrenalin	3,9	44,0	0,2	3,6 ^a	12,8 ^a	0,6 ^a	2,0 ^a	0,1 ^a	1,1 ^a	4,1	0,02	0,9
Adrenalin				3,7	59,8	2,9	3,9	1,1	4,8			

I, molare Konzentration der ¹⁴C-Amine in Liquor als Inkubationsmedium. RF, an die RF-Substanz gebundene ¹⁴C-Aminmenge in Mol/mg. R, Verteilungsquotient $\frac{\text{Imp./min pro } \mu\text{l RF-Substanz}}{\text{Imp./min pro } \mu\text{l Inkubationsmedium}}$. Die Angaben sind Mittelwerte aus Doppelproben. ^a Mittelwerte aus 3 oder 4 Proben von 2 Versuchsreihen, bei denen die molare Konzentration des NA im Inkubationsmedium um etwa 20% differierte.

Glia- und Nervengewebe zu beeinträchtigen vermöchten (Bindungstheorie). Die Konzentration an RF-Substanz im Zentralkanal des Rückenmarkes³ und der Nachweis biogener Amine im Liquor^{4,5} lassen es berechtigt erscheinen, die Bindungstheorie experimentell zu überprüfen^{6,7}.

Material und Methoden. Der RF wurde mit einer in den Zentralkanal eingeführten Pipette aus Rückenmarksstücken des Rindes (frisches Schlachthofmaterial) gespült⁸. Fadenstücke mit einer Gesamtlänge von ca. 3 m, das heisst etwa 0,1 mg Trockengewicht RF-Substanz, wurden 60 min bei 37°C in 1,5 ml künstlichem Liquor⁹, pH 7,3–7,4, die ¹⁴C-Noradrenalin (NA)- oder ¹⁴C-Adrenalinbitartrat (A) bzw. ¹⁴C-Serotoninkreatininsulfat (5-HT) in Konzentrationen von 10⁻⁴ bis 10⁻⁹ M (bezogen auf die Base) enthielten, inkubiert. Die RF-Proben wurden nach der Inkubation 2–3mal je 60 min mit Liquor gewaschen.

Variationen der Versuchsdurchführung: 1. Lösungen von ¹⁴C-Monoaminen in Aqua destillata dienten als Inkubationsmedium. 2. Aqua destillata bzw. Lösungen von NA in destilliertem Wasser dienten als Waschlösungen. 3. Die Waschzeit mit Liquor betrug 24 h.

Die getrockneten und gewogenen RF-Proben wurden in 0,5 N NaOH hydrolysiert und anschliessend ihre Radioaktivität ebenso wie die von Vergleichsproben (Inkubationsmedien, Waschlösungen) mit einem PPO/POPOP-Szintillator auf Dioxanbasis im Tri-Carb-Spektrometer bestimmt.

Ergebnisse. Am RF-Material sind nach der Inkubation in ¹⁴C-Aminlösungen und Waschungen mit isotonenfreien Medien (künstlicher Liquor, Wasser bzw. wässrige Aminlösungen) radioaktive Substanzen nachweisbar. Die Radioaktivität der letzten Waschlösung beträgt in einem dem Volumen der inkubierten Probe entsprechenden Anteil durchschnittlich 0,2% (0–1,2%) der Aktivität des RF-Materials.

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen werden offenbar 5-HT, NA und A am Glykoprotein des RF irreversibel gebunden. Bei einer NA-Konzentration von 1,7 × 10⁻⁷ M beträgt der pH-Wert einer wässrigen Lösung etwa 5,4. RF-Proben enthalten nach der Inkubation in diesem Medium nur annähernd die Hälfte der NA-Mengen, die nach der Inkubation in einer NA-Lösung gleicher Konzentration in Liquor (pH etwa 7,3) gemessen werden. Inkubation bei einem pH von etwa 4,1 (3,6 × 10⁻⁴ M wässrige Lösung von NA) senkt die gebundene Aminmenge sogar auf etwa 4% der entsprechenden Liquorwerte (pH 7,3).

Die Bindung von Aminen an das Glykoprotein sinkt mit der Aminkonzentration (Tabelle). Bei einem Aminangebot von $\approx 4 \times 10^{-9}$ M kann keine Radioaktivität an den inkubierten 0,1 mg RF-Glykoprotein nachgewiesen werden. Die pro mg RF-Glykoprotein gebundenen Aminmengen liegen im bzw. wenig über dem ng-Bereich, wobei zwischen den einzelnen Aminen selbst unter gleichen

Inkubationsbedingungen Unterschiede auftreten. So werden bei einem Angebot von 10⁻⁵ M 5-HT, NA und A in einem Verhältnis von etwa 1:8:40 an das RF-Glykoprotein gebunden.

Der RF ist ein annähernd zylindrisch geformter Sekretstabs. Damit ist es möglich, das Volumen der in das Inkubationsmedium eingesetzten RF-Substanz unter Zugrundelegung der durch Wolf⁸ mitgeteilten Werte zu ermitteln und im weiteren die spezifische Aktivität im RF-Volumen zu errechnen. Diese spezifische Aktivität des RF-Materials kann (R-Werte der Tabelle) grösser sein als die spezifische Aktivität des Inkubationsmediums. Aus dem Verteilungsquotienten R ist ebenfalls ableitbar, dass die Bindung von Aminen an die RF-Substanz in der Reihenfolge A-NA-5-HT abnimmt.

Diskussion. Der RF, ein zylindrisch geformter und fibrillär strukturierter Kohlenhydrat-Protein-Komplex⁸, bindet Serotonin, Noradrenalin und Adrenalin, wenn diese Amine im Inkubationsmedium in Konzentrationen zwischen 10⁻⁴ und 10⁻⁸ M enthalten sind. Die in ähnlichen Versuchen^{10–13} an Proteide gebundenen Aminmengen steigen im allgemeinen mit der Aminkonzentration im Inkubationsmedium und dem pH-Wert. Gleiches gilt für den RF.

Untersuchungen darüber, ob die mikroskopisch sichtbaren Strukturveränderungen des RF beim Übersichten mit Monoaminlösungen in stärkerer Masse auf den pH-Wert im Inkubationsmedium zurückgehen, als aus den früheren Versuchsreihen zunächst zu folgern war⁷, sind noch nicht abgeschlossen. Das Glykoprotein des RF bindet bei gleichem Angebot A, NA und 5-HT in unterschiedlichen Mengen. Ähnliche Ergebnisse über die Bindung von verschiedenen Aminen an Proteide sind bekannt^{11,13}.

Aus den für den Verteilungsquotienten R ermittelten Werten ist zu entnehmen, dass der RF NA bei einer Konzentration von 10⁻⁷ M sowie A bei Konzentrationen von 10⁻⁵ und 10⁻⁷ M «sammelt». Bei geringeren Konzentra-

⁴ H. DAVSON, *Physiology of the Cerebrospinal Fluid* (J. und A. Churchill Ltd., London 1967).

⁵ S. J. DENCKER und C. J. HÄGGENDAL, in *Zirkumventrikuläre Organe und Liquor*, Symposiumsbericht (G. Sterba, Jena 1969).

⁶ G. STERBA, J. HESS und A. ERMISCH, *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 310, 271 (1969).

⁷ G. STERBA und A. ERMISCH, *Acta biol. med. germ.* 22, K9 (1969).

⁸ G. WOLF, in *Zirkumventrikuläre Organe und Liquor*, Symposiumsbericht (G. Sterba, Jena 1969).

⁹ J. K. MERLIS, zitiert in K. FLEISCHHAUER, *Z. Zellforsch.* 62, 639 (1964).

¹⁰ R. M. MARCHEBANKS, *J. Neurochem.* 13, 1481 (1966).

¹¹ L. C. MOKRASCH und R. ANDELMAN, *J. Neurochem.* 15, 1207 (1968).

¹² W. GIELEN, *Naturwissenschaften* 55, 104 (1968).

¹³ C. H. ABORG und B. UVNÄS, *Acta physiol. scand.* 74, 552 (1968).

tionen kann dieser Effekt möglicherweise deshalb nicht sichergestellt werden, weil bei den gewählten Volumenrelationen zwischen Inkubationsmedium (1,5 ml) und RF-Substanz (6 µl) und einer einstündigen Inkubationszeit vermutlich nicht ausreichend Aminmoleküle in die Nähe von Ankergruppen der Fadenmoleküle gelangen. Auf Schüttelbewegungen während der Inkubation zur Beschleunigung der Diffusion musste weitgehend verzichtet werden, da die sehr geringe Masse des RF-Materials sonst an den Wänden der Untersuchungsgefäße haften und verkleben kann.

Gebundene Amine sind am RF auch nach mehrstündigen Waschungen mit den gewählten Medien nachweisbar. Damit dürfte der Bindungstyp im vorliegenden Falle nicht nur durch Ionenbeziehungen gegeben sein (vgl. ^{10,12}). Möglicherweise bestehen ähnliche Verhältnisse, wie sie MOKRASCH und ANDELMAN¹¹ bei der Untersuchung eines Bindungstypes zwischen Lipoproteiden aus dem Hirn und Aminen beschreiben. Anzeichen dafür, dass an die RF-Substanz primär zusätzlich Aminmengen gebunden und während des Waschvorganges im Sinne eines Ionenaustausches freigesetzt werden, ergaben sich nicht.

Die Problematik einer möglichen physiologischen Bedeutung der Aminbindung an den RF ist sehr komplex. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass der RF an einer Regulation des Liquor-Amin-Pegels beteiligt ist, wenn die in vitro gefundene Bindung von Monoaminen

auch in vivo stattfindet. Als Hinweise auf diese Möglichkeit ist zu werten, dass der RF von Katzen in vivo ³H-Tyrosin binden kann⁶.

Da im Bereich des Zentralkanales die RF-Masse (Frischgewicht) zum Teil mehrere Prozent der Liquormasse³ beträgt und auffällige Unterschiede im Bindungsvermögen der RF-Substanz selbst gegenüber ähnlichen Molekülen (A und NA) gefunden werden, kann in den vorliegenden Ergebnissen ein erster Ansatzpunkt zur weiteren experimentellen Überprüfung der Bindungstheorie, die zum Beispiel auch unter Einsatz von bestimmten Metaboliten erfolgen sollte, gesehen werden.

Summary. The glycoprotein of Reissner's fibre is able to bind norepinephrine, epinephrine and serotonin. Bound amines can be demonstrated at the RF, even after washing with artificial cerebrospinal fluid for some hours. It is discussed whether it is a function of the RF to remove substances, for instance biogenic amines, from the cerebrospinal fluid.

A. ERMISCH, G. STERBA
und J. HESS

*Sektion Biowissenschaften der Karl-Marx-Universität,
Talstrasse 33, 701 Leipzig (DDR), 8. Juni 1970.*

Further Studies on the Circadian Rhythm in the Proliferative Activity of Mouse Intestinal Epithelium

Circadian rhythm in cell proliferation of intestinal mucosal cells have been disputed. BULLOUGH¹ in 1948 and ALOV² in 1963 have reported slight and variable rhythms in proliferative activity while KLEIN and GEISEL³, LEBLOND and STEVENS⁴ and PILGRIM, ERB and MAUER⁵ could not show similar results. SIGDESTAD et al.⁶ using the crypt squash technique were able to demonstrate a distinct daily rhythm in the number of cells synthesizing DNA and the number of cells in mitosis. They found the peak and nadir of both parameters tested at 03.00 and 15.00 h respectively. It was the purpose of this investigation to further resolve the peaks in mitosis and DNA synthesis in mouse intestinal epithelium.

Male C57Bl (Schmidt, Madison, Wisc.), 140–150-day-old mice were used throughout this investigation. They were maintained on sterilized Purina Laboratory Chow and tap water ad libitum. The animal rooms were maintained at a constant temperature and humidity and on a strict 12 h light (06.00–18.00 h) and a 12 h dark (18.00 to 06.00 h) cycle. At hourly intervals between (24.00 and 05.00 h) 3 mice were injected i.p. with 50 µCi tritiated thymidine (³HTdR, 0.36 Ci/mM) and sacrificed by cervical dislocation 30 min later. Cold Carnoy's solution was injected into the jejunum just below the ligament of Treitz. A segment was removed for the determination of the number of mitotic figures and labeled nuclei per crypt using crypt squash and autoradiographic techniques described by WIMBER et al.⁷

The amount of tritiated thymidine taken up by each crypt was determined by liquid scintillation counting. 50 crypts were pipetted into liquid scintillation vials containing 0.5 ml Soluene (Packard Instrument Co., Downers Grove, Ill.), allowed to stand at room temperature for 30 min then 10 ml scintillation solution (5.0 g PPO, 0.2 g M₂POPOP in 1000 ml toluene) was added.

The vials were counted in a Packard Liquid Scintillation Spectrometer, Model 3380 operated at 5°C; quench correction utilized the absolute activity Analyzer (model 544).

The results are presented in Figures 1–3. Utilizing closer test intervals in the present experiments it was possible to resolve the peak in the number of cells in mitosis and in the number of cells synthesizing DNA. The peak previously reported at 03.00 h was replaced by a peak at 02.00 h. Good correlation was seen in the data, at times duplicated in the previously reported results.

Unlike previous data there was no suggestion of a lag in the peak in mitosis relative to the DNA synthetic peak.

In a previous report⁶ we reported a distinct diurnal rhythm in mitotic figures, S cells and dpm/crypt measurements in the mouse intestine. The peak was found to occur at 03.00 h while the nadir was seen at 15.00 h. The experiments reported here, have further resolved the peak in the 3 parameters tested to occur at 02.00 h. The significance of these results rests in the interpretation of the mechanisms involved in the diurnal control of cell proliferation in the gut.

PILGRIM, ERB and MAUER⁵ and more recently BROWN and BERRY⁸ suggested that diurnal rhythm may be due to partial synchronization of the cells in the DNA syn-

¹ W. S. BULLOUGH, Proc. R. Soc. Ser. B 135, 212 (1948).

² I. A. ALOV, Fedn Proc. 22, T357 (1963) (translated supplement).

³ H. KLEIN and H. GEISEL, Klin. Wschr. 25, 662 (1947).

⁴ C. P. LEBLOND and C. E. STEVENS, Anat. Rec. 100, 357 (1948).

⁵ C. PILGRIM, W. ERB and W. MAUER, Nature 199, 863 (1963).

⁶ C. P. SIGDESTAD, JANIE BAUMAN and S. LESHAR, Expl Cell Res. 58, 159 (1969).

⁷ R. E. WIMBER, H. QUASTLER, O. L. STEIN and D. R. WIMBER, J. biophys. biochem. Cytol. 8, 327 (1960).

⁸ J. M. BROWN and R. J. BERRY, J. Cell Tissue Kinet. 1, 23 (1968).