

and dose-dependently by accumulation at the water/air interface<sup>5,14</sup>. In high concentrations, prenylamine destroys the membranes of erythrocytes, chromaffine granules, mast cells, and probably also of platelets – which results in the release of hemoglobin, catecholamines, histamine, and serotonin, respectively<sup>14–17</sup>. In low concentrations, the drugs produce a membrane ‘stabilising’ effect<sup>18</sup>. Electron micrographs showed swelling of the membranes of mast cells and chromaffine granules. This effect was temperature-independent and therefore should be brought about by a non-energy-requiring mechanism of action<sup>14,16</sup>.

Consequently, inhibition of uptake of serotonin and adrenaline or swelling of serotonin storing granules of

blood platelets and chromaffine granules can be assumed to be the result of a nonspecific, merely physicochemical interaction of the drugs investigated with subcellular and cellular membranes.

**Zusammenfassung.** In einer unspezifischen, physikalisch-chemischen Wirkung von vier oberflächenaktiven Coronardilatoren auf die Membranen von menschlichen Thrombozyten und isolierten chromaffinen Granula wird die Ursache für die Hemmung der Aufnahme von Serotonin bzw. Adrenalin erblickt.

H. GROBECKER<sup>19</sup> und B. LEMMER

Pharmakologisches Institut der Universität,  
D-6 Frankfurt am Main (Germany), 14 September 1970.

Concentration causing 50% inhibition of <sup>14</sup>C-adrenaline uptake by isolated chromaffine granules (cattle)

	× 10 <sup>-5</sup> M
Prenylamine (Segontin®)	0.2
Oxyfedrine (Ildamen®)	1
Verapamil (Isoptin®)	4
Carbochromenum (Intensain®)	10

Glycylglycine pH 7.3, ATP and MgCl<sub>2</sub> 0.0025 M, 37°C 15 min.

<sup>14</sup> H. GROBECKER, P. HOLTZ, D. PALM, I. J. BAK and R. HASSLER, *Experientia* 24, 701 (1968).

<sup>15</sup> W. BARTHEL and F. MARKWARDT, *Biochem. Pharmac.* 18, 1899 (1969).

<sup>16</sup> S.-E. JANSSON, *Acta physiol. scand.* 78, 420 (1970).

<sup>17</sup> A. GIOTTI and P. F. MANNAIONI, *Biochim. appl.* 14, Suppl. 1, 267 (1968).

<sup>18</sup> P. SEEMAN, *Biochem. Pharmac.* 15, 1767 (1966).

<sup>19</sup> Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

## Mesothelzellveränderungen nach der intraperitonealen Injektion von denaturiertem Phytohaemagglutinin<sup>1</sup>

Natives Phytohaemagglutinin (PHA) induziert in peritonealen Zellen eine Produktion von Hyaluronsäure, die mit morphologischen Mesothelzellveränderungen korreliert ist (MOHR et al.<sup>2a,b</sup>). Dieser Reaktion folgt eine Proliferationswelle im Mesothelzellverband (MOHR et al.<sup>2c</sup>). Hitzedenaturiertes PHA führt weder zu einer Transformation der Lymphozyten in vitro (NOWELL<sup>3</sup>), noch hat es einen Einfluss auf die primäre Immunantwort gemessen an der Anzahl der plaquebildenden Zellen (SPREAFICO und LERNER<sup>4</sup>). In den lymphatischen Organen führt denaturiertes PHA im Gegensatz zum nativen PHA nicht zur Vermehrung undifferenzierter Zellen (MACHADO et al.<sup>5</sup>). Daher sollte in den vorliegenden Untersuchungen die Reaktion der Peritonealzellen auf die i.p. Injektion von hitzedenaturiertem PHA ermittelt werden.

**Material und Methode.** Phytohaemagglutinin (PHA-P, Difco Laboratories, Detroit) wurde nach der Rehydrierung mit Aqua dest. (5 ml Aqua dest. pro Ampulle Trockensubstanz PHA-P) 30 min bei 120°C autoklaviert. Von dieser Lösung erhielten 5 männliche, 4 Wochen alte SIV-50 Ratten (S. Ivanovas, Med. Versuchstierzuchten, Kisslegg/Allgäu) mit einem Durchschnittsgewicht von 70 g je 1,0 ml i.p. injiziert. 3 Kontrolltiere blieben unbehandelt. 48 h nach der Injektion wurden die Tiere in Äthernarkose dekapitiert, da nach vorausgegangenen Untersuchungen mit nativem PHA die morphologischen Veränderungen zu diesem Zeitpunkt am stärksten sind und sich ein hoher Gehalt an Hyaluronsäure in der Peritonealflüssigkeit nachweisen lässt (MOHR et al.<sup>2a,b</sup>).

In der Peritonealflüssigkeit wurde der Hyaluronsäuregehalt chemisch bestimmt<sup>6</sup>. Weiterhin wurden Ausstrichpräparate der Peritonealflüssigkeit hergestellt und nach Pappenheim gefärbt. Vom parietalen und diaphragmalen

Peritonealmesothel wurden nach der Methode von BENEKE et al.<sup>7</sup> Häutchenpräparate angefertigt, die mit Haematoxylin-Eosin gefärbt wurden. In den Ausstrichpräparaten wurden die Zellen differenziert, die Häutchenpräparate wurden auf morphologische Veränderungen untersucht.

**Ergebnisse.** 1. Peritonealflüssigkeit. Während die Peritonealflüssigkeit von Kontrolltieren keine neutrophilen Granulozyten enthält, fand sich 48 h nach der Injektion von denaturiertem PHA eine neutrophile Reaktion (Tabelle). Die Rundzellen zeigten meist einen breiten basophilen Zytoplasmasaum. Vereinzelt Rundzellen enthielten solitäre Zytoplasmavakuolen oder phagozytierte Kernreste neutrophiler Granulozyten. Hyaluronsäure konnte in der Peritonealflüssigkeit chemisch nicht nachgewiesen werden.

2. Mesothelzellen. Unter physiologischen Bedingungen wird das parietale Peritoneum von einem einschichtigen geschlossenen Mesothelzellverband mit meist nicht sicht-

<sup>1</sup> Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

<sup>2</sup> a W. MOHR, G. BENEKE und L. MURR, *Experientia* 26, 1347 (1970);

<sup>b</sup> Beitr. Path., 142, 90 (1970); <sup>c</sup> in Vorbereitung; <sup>d</sup> in Vorbereitung.

<sup>3</sup> P. C. NOWELL, *Cancer Res.* 20, 462 (1960).

<sup>4</sup> F. SPREAFICO and E. M. LERNER II, *J. Immun.* 98, 407 (1967).

<sup>5</sup> E. A. MACHADO, B. B. LOZZIO und J. A. CHERNOFF, *Arch. Path.* 88, 118 (1969).

<sup>6</sup> Für die chemischen Untersuchungen danken wir Herrn PD Dr. H. GREILING, Klin.-chem. Labor der Medizinischen Fakultät der Rhein.-Westf. Hochschule in Aachen.

<sup>7</sup> G. BENEKE, H. W. FEIGEL und W. MOHR, *Gerontologia*, 16, 283 (1970).

barem Interzellularraum gebildet. Das Zytoplasma dieser Zellen färbt sich homogen schwach mit Eosin an. Nach der Injektion von denaturiertem PHA ist der Interzellularraum verbreitert, die Mesothelzellen oft abgerundet (Figur a) oder länglich ausgezogen. Zwischen den Mesothelzellen

in den verbreiterten Interzellularräumen erkennt man neutrophile Granulozyten (Figur b). In wenigen Mesothelzellen sieht man kleine Zytoplasmavakuolen (Figur b). Nur selten finden sich isoliert liegend Siegelringzellen, die z.T. zwei Zellkerne enthalten (Figur c). Kernteilungsfiguren sind in den Mesothelzellen häufig vorhanden (Figur d).

Das Mesothel des diaphragmalen Peritoneums zeigt unter physiologischen Bedingungen einen periodischen Aufbau aus zeldichten und zellarmen Arealen, die aus polygonal gestalteten Mesothelzellen bestehen. Nach der Injektion von denaturiertem PHA gleichen die morphologischen Veränderungen denen, die im parietalen Peritoneum beschrieben wurden. In einzelnen Mesothelzellen lassen sich Zytoplasmavakuolen erkennen. Siegelringzellen, die zum Teil zwei Zellkerne enthalten, kommen nur selten vor. Wie im parietalen Peritoneum erkennt man auch hier häufig Kernteilungsfiguren.

**Diskussion.** Nach der i.p. Injektion von hitzedenaturiertem PHA kommt es zum Auftreten von neutrophilen Granulozyten in der Peritonealflüssigkeit. Eine Viskositätszunahme der Peritonealflüssigkeit, wie sie nach der i.p. Injektion von nativem PHA auftritt und durch Hyaluronsäure bedingt ist (MOHR et al.<sup>2a, b</sup>), konnte nicht nachgewiesen werden. Siegelringzellen, die vereinzelt in der Peritonealflüssigkeit nach der Injektion von nativem

Relative Zellzahlen in der Peritonealflüssigkeit von unbehandelten Kontrolltieren und Versuchstieren 48 h nach der i.p. Injektion von hitzedenaturiertem PHA.

Zelltyp	Relative Zellzahlen (%)			
	Kontrolltiere		Versuchstiere 48 h nach der i.p. Applikation von denaturiertem PHA	
	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S
Rundzellen	83,1	$\pm 0,6$	59,1	$\pm 3,8$
Eosinophile Granulozyten	13,1	$\pm 2,1$	3,1	$\pm 2,8$
Neutrophile Granulozyten	0,0	$\pm 0,0$	37,8	$\pm 3,2$
Mastzellen	3,7	$\pm 2,5$	0,0	$\pm 0,0$

( $\bar{X}$  = Mittelwert; S = Standardabweichung)

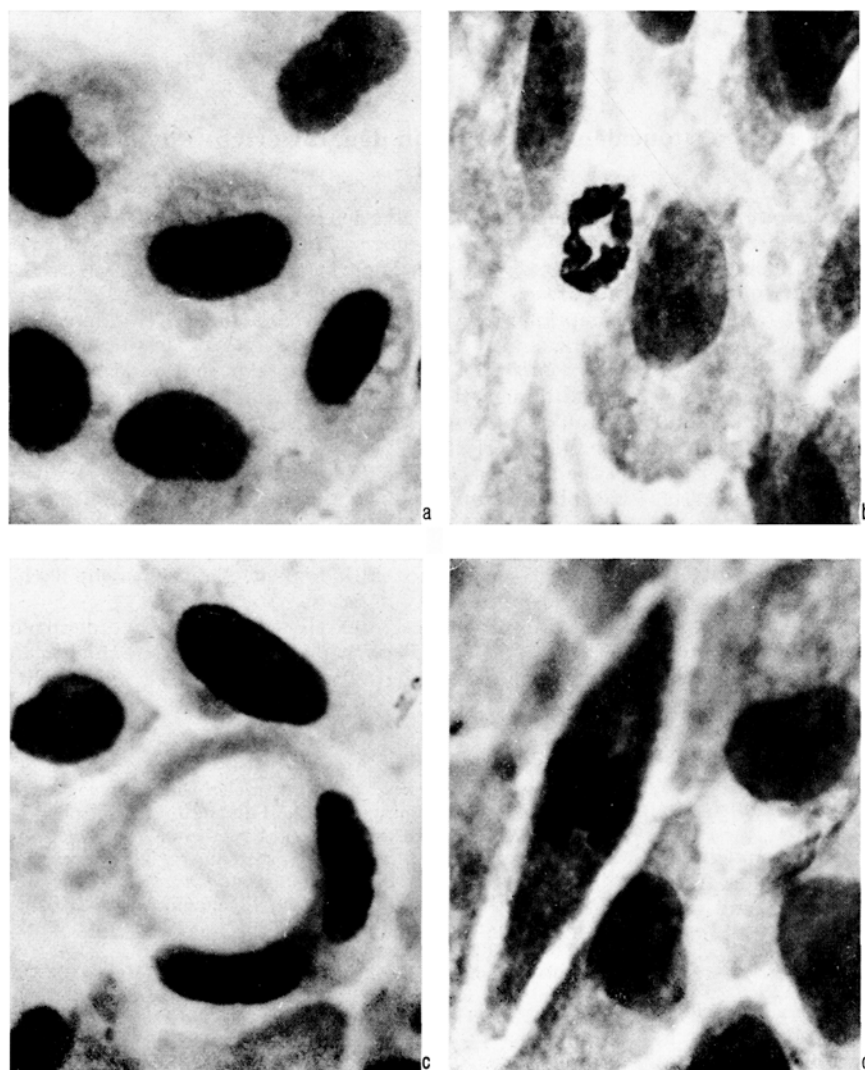


Fig. 1. Häutchenpräparate des parietalen Peritoneums 48 h nach der i.p. Injektion von hitzedenaturiertem PHA. Färbung: Haematoxylin-Eosin. Vergrößerung  $\times 1400$ .

- a) Abgerundete Mesothelzellen mit Zytoplasmavakuolen und verbreitertem Interzellularraum.
- b) Neutrophiler Granulozyt zwischen den Mesothelzellen im verbreiterten Interzellularraum.
- c) Zweikernige Siegelringzelle.
- d) Kernteilungsfigur (beginnende Metaphase) in einer spindelförmigen Mesothelzelle.

PHA auftraten, fanden sich in den Ausstrichpräparaten auch nicht.

Die Mesothelzellveränderungen, die qualitativ denen nach der Injektion von nativem PHA entsprechen, waren jedoch sehr viel geringer ausgeprägt. Sowohl Zytoplasmavakuolen als auch Siegelringzellen kamen nur selten vor. Dagegen führte auch die Applikation von denaturiertem PHA zu einer Proliferation von Mesothelzellen.

Durch die Hitzedenaturierung verliert das PHA die Fähigkeit, eine messbare Hyaluronsäureproduktion zu stimulieren. Die morphologischen Veränderungen der Mesothelzellen sind nur gering. Da durch die histochemischen Untersuchungen eine Hyaluronsäuresynthese in den multivakuolären Mesothelzellen und Siegelringzellen wahrscheinlich gemacht werden konnte (MOHR et al.<sup>2a</sup>), ist zu vermuten, dass es nur zu einer geringen Hyaluronsäureproduktion unter dem Einfluss des denaturierten PHA gekommen ist, die mit der angewandten Methode, bei der die unterste Grenze der noch messbaren Hyaluron-

säurekonzentration bei 5 mg/100 ml liegt, nicht ermittelt werden konnte.

**Summary.** After the i.p. injection of heat denatured PHA, mesothelial cell changes are similar to those found after the application of natural PHA. While vacuolization of mesothelial cells and signet ring cell formation is strongly marked after the injection of natural PHA, this reaction is minor if denatured PHA is used. Furthermore, the peritoneal fluid does not contain hyaluronic acid in detectable amounts.

W. MOHR, G. BENEKE und L. MURR

*Abteilung Pathologie II des Zentrums für Biologie und Theoretische Medizin der Universität, Steinhövelstrasse 9, D-79 Ulm (Deutschland), 21. September 1970.*

### Mitochondrial Changes in the Guinea-Pig Muscle after Envenomation with *Vespa orientalis* Venom

Most wasps sting and kill their prey by paralysis<sup>1</sup>. The prey of wasps consists mainly of insects. Reports concerning wasp stings in humans indicate that hymenoptera stings result in an allergic response manifested by urticaria, angioedema, syncope, vascular collapse and respiratory obstruction<sup>2,3</sup>. Neurological symptoms due to wasp stings are rare but, when they do occur, they complicate anaphylactic shock<sup>4-5</sup>. The site of action of the paralyzing venom is as yet unidentified: neuromuscular junction, peripheral nerves and the central nervous system have been incriminated<sup>6</sup>.

In the present study, the ultrastructure of muscle and neuromuscular junction following envenomation with *Vespa orientalis* venom has been investigated.

The venom was milked from ether-anesthetized wasps by pressure on the upper abdomen and then by collecting the venom into a capillary. The venom was dried in a lyophilizer. 100 µg of the venom were dissolved in 1 ml

of saline, and 0.1 ml was injected into the lower lip of a guinea-pig. A wedge dissection of the injected area was cut 3 h after the injection, and the specimen was divided into 2 halves. One half was taken for optical microscopic study, and the other for electron microscopic study.

Microscopic examination revealed mild edema of the sub-epidermal tissue, with an inflammatory exudate composed mainly of polymorphonuclear leucocytes. Under the electron microscope the inflammatory reaction was seen in the sub-epidermal tissue. The mitochondria of fibroblasts and endothelial cells were normal. Significant changes were observed in the mitochondria of the striated muscle and the neuromuscular junction. The cristae gave the impression of having collapsed, agglutinating in the middle or adhering to the inner membrane of the mitochondrion. Clumped cristae dissolved into an amorphous granular material in which remnants of the mitochondrial



Fig. 1. Group of mitochondria near neuromuscular junction with severe alteration of inner structure.



Fig. 2. Higher magnification of mitochondria with clumping and dissolution of mitochondria.