

### Einbau von $H^3$ -Thymidin in Zellen und Gewebe von *Helix pomatia* L. (Gastropoda, Pulmonata)

Über die Teilungsaktivität in Geweben von Gastropoden ist mit Ausnahme der häufiger untersuchten Gonaden bislang nichts Genaueres bekannt geworden. Daher wurde mit Hilfe der «Tracer»-Technik versucht, für die Weinbergschnecke *Helix pomatia* erste Hinweise zu erhalten. Erwachsenen Exemplaren dieser Schneckenart wurden jeweils 375  $\mu$ Ci  $H^3$ -Thymidin (spez. Aktivität 17,4 Ci/mM) unmittelbar nach dem künstlichen Aufwecken aus der Winterruhe (April) in die Körperhöhle injiziert und die Versuchstiere (Vt) 6 und 24 h nach der Injektion (pI) präpariert. Bereits 4 Wochen vor Versuchsbeginn aktivierten adulten und juvenilen (250  $\mu$ Ci pro Tier, durchschnittlich 2jährige Schnecken) *Helix pomatia* wurde im gleichen Versuch ebenfalls der «Tracer» injiziert, die adulten Tiere 6 und 24 h und die juvenilen Tiere 6 h, 24 h und 8 Tage pI präpariert. Um mögliche grössere, jahreszeitlich bedingte Schwankungen in der Teilungsaktivität zu erfassen und um Inkubationen über einen längeren Zeitraum durchzuführen, wurde im August adulten und juvenilen Weinbergschnecken wiederum  $H^3$ -Thymidin injiziert. Während alle juvenilen Vt vor Versuchsende starben, konnten die adulten Vt 23 und 36 Tage pI präpariert werden. Die Gewebe dieser Tiere zeigten keine pathologischen Veränderungen. Fixiert (Bouinsche Lösung) und weiterverarbeitet (Einbettung in Paraffin, Schnittdicke 10  $\mu$ m, Kodak Stripping Film AR 10, Expositionsdauer 40 Tage) wurden folgende Organe: Schlundring, Augenfühler, Teile der Epidermis mit darunterliegendem Bindegewebe, Gonade, Spermidukt und Teile des Darmes; davon wurden bisher Schlundring, Augenfühler und Epidermis ausgewertet.

Die Ergebnisse der Frühjahrs- und Sommerversuche mit  $H^3$ -Thymidin zeigen für die ausgewerteten Organe generell eine höhere Teilungsaktivität bei den juvenilen Tieren. Der Einbau des «Tracers» in Zellkerne der unter-

suchten Gewebe bei adulten Schnecken war wesentlich geringer. Hervorzuheben ist, dass von allen Vt nur bei einem juvenilen Exemplar 8 Tage pI der Kern einer Nervenzelle im Oberschlundganglion markiert war (Figur 1a). Da keine weiteren markierten Nervenzellkerne gefunden werden konnten, muss angenommen werden, dass die mitotische Vermehrung oder die endomitotische Polyploidisierung der Nervenzellen zu den Jahreszeiten, in denen die Versuche durchgeführt wurden, nicht abläuft, oder bereits bei 2jährigen Weinbergschnecken mehr oder weniger abgeschlossen ist. Im Gegensatz dazu fanden sich bei fast allen Vt markierte Gliazellkerne (Figur 1b). Lediglich diejenigen adulten Schnecken, denen unmittelbar nach dem Aufwecken aus der Winterruhe der «Tracer» appliziert und die 6 h pI präpariert worden waren, besaßen in ihren Ganglien keine markierten Gliazellkerne. 24 h pI sind in den Oberschlundganglien eines adulten aktiven Vt keine und im gesamten Unterschlundganglienkomplex insgesamt 18 markierte Gliazellkerne zu finden. Ein parallel dazu inkubiertes und präpariertes juveniles Vt enthielt in den Oberschlundganglien ungefähr 1700 und in den Unterschlundganglien insgesamt ungefähr 2500 markierte Gliazellkerne. 8 Tage pI zeigte sich bei adulten und juvenilen Vt nur eine unwesentliche Erhöhung der Zahl der markierten Gliazellkerne. Die im August mit einer längeren Inkubationszeit durchgeführten Versuche ergaben für eine adulte Weinbergschnecke 23 Tage pI 19 markierte Gliakerne in den Oberschlundganglien und 168 markierte Zellkerne des gleichen Gewebes in den Unterschlundganglien. Ähnlich waren die Verhältnisse 36 Tage pI. Es ist daher anzunehmen, dass bei adulten Weinbergschnecken die Teilungsaktivität des Gliagewebes im Frühjahr und Sommer nicht wesentlich unterschiedlich ist. Die grössere Zahl an markierten Gliazellkernen im Sommer ist durch die längere Inkubationsdauer bedingt. Interessant war noch, dass einige der im Procerebrum liegenden sogenannten «Randzellen», von denen nicht eindeutig feststeht, ob es sich um Nervenzellen handelt<sup>1</sup>, bei juvenilen und adulten Vt sowohl kurz nach der Winterruhe als auch bei den Langzeitversuchen markierte Kerne besaßen.

Der schon am Nervengewebe erkennbare generelle Trend erhöhter Teilungsaktivität bei juvenilen Schnecken kommt vor allem für das Bindegewebe deutlich zum

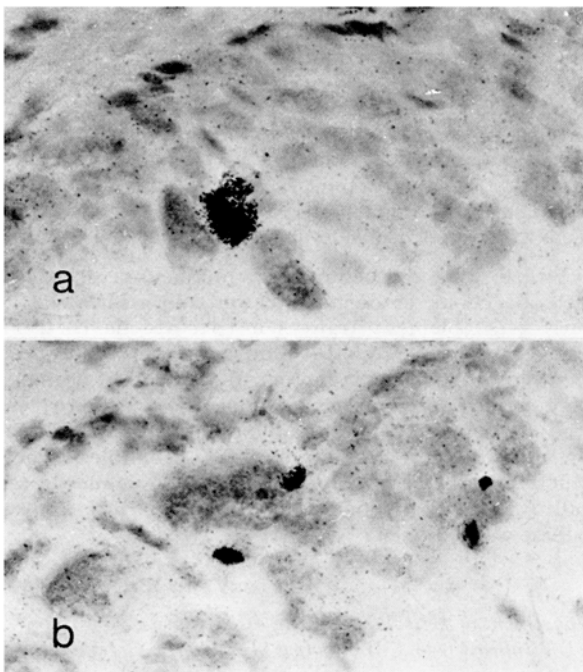


Fig. 1. *Helix pomatia*, juvenil, 8 Tage pI. a) Einbau von  $H^3$ -Thymidin in den Zellkern einer Nervenzelle. b) Einbau des «Tracers» in Gliazellkerne. Man beachte die Grössenunterschiede der markierten Zellkerne in a) und b).  $\times 320$ .

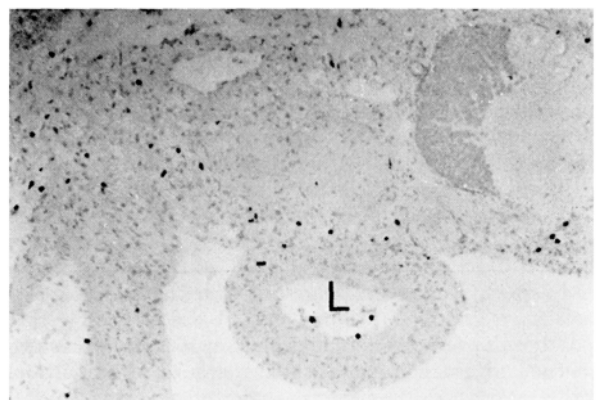


Fig. 2. Übersicht über die Verteilung von markierten Bindegewebszellkernen im Bereich der Oberschlundganglien von *Helix pomatia*, juvenil, 8 Tage pI. Man beachte die markierten Kerne von Blutzellen im Gefässlumen (L).  $\times 100$ .

Ausdruck. Überall im Bindegewebe juveniler Weinbergsschnecken finden sich markierte Zellkerne in unregelmässiger Verteilung (Figur 2), und zwar 6 h bis 8 Tage nach der Injektion der «Tracers». Die adulten Vt besaßen im April kurz nach der Winterruhe im Bindegewebe nur sehr wenige markierte Zellkerne, deren Zahl nach 36tägiger Inkubation im August zwar grösser war, aber nicht die Teilungsaktivität des juvenilen Bindegewebes erreichte. Im Bindegewebe um die Schlundringganglien, im Augenföhler und unter der Epidermis wiesen weder Muskel- und Blasen Zellen noch Körnchen- und Pigmentzellen markierte Zellkerne auf. Bei der Inkorporation des «Tracers» in Bindegewebezellkerne muss es sich also um Kerne noch nicht ausdifferenzierter Fibrozyten handeln, oder um Fibroblasten, die als embryonale Bindegewebezellen auch noch im Bindegewebe adulter Schnecken vorkommen und sowohl im Frühjahr als auch im Sommer Teilungen durchführen. Auffällig waren die zahlreichen Markierungen der Kerne von Blutzellen bei juvenilen Vt (Figur 2), was in stark verminderter Zahl auch noch bei adulten Tieren festzustellen war. Ausserdem zeigte sich, wiederum bei juvenilen Tieren vermehrt, dass im Zellverband, der das Lumen der Gefässe auskleidet, stets markierte Kerne vorhanden waren, die sich teilweise mit ihren Zellen in das Gefässlumen vorwölbten. Es besteht daher die Möglichkeit, dass ein Teil der Blutzellen von *Helix pomatia* durch Mitosen bestimmter Zellen in der Gefässwand entstehen. Zum Abschluss soll noch erwähnt werden, dass in der einschichtigen Epidermis juveniler und adulter Weinbergsschnecken stets markierte Zellkerne anzutreffen waren. Es scheint sich dabei um Teilungen epidermaler Ersatzzellen zu handeln, die in unregelmässiger Verteilung zwischen den hochprismatischen Epithelzellen vorkommen. Das Bindegewebe unter der Epidermis enthielt im Vergleich zum Bindegewebe um die Schlundringganglien – auch bei juvenilen Vt – nur eine geringe Zahl an markierten Zellkernen. Es kann daher vermutet werden, dass hierin ein Grund für die bei Gastropoden bekannte mangelnde Regenerationsfähigkeit der Haut zum Ausdruck kommt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass in den bisher untersuchten Organen und Geweben von juvenilen und adulten *Helix pomatia* stets Zellteilungen vorkommen. Eine Vermehrung der Nervenzellen durch Teilungen ist in den zentralen Ganglien wahrscheinlich früh in der Ontogenese abgeschlossen<sup>2</sup>, eine Grössenzunahme der Nervenzellen in der letzten Wachstumsphase juveniler zweijähriger Tiere kann vermutlich nur noch durch Polyploidisierung erfolgen<sup>3</sup>. Zur bekannten Grössenzunahme der Ganglien<sup>2</sup> tragen wahrscheinlich auch die zahlreichen Teilungen im Gliagewebe bei, die auch bei adulten Tieren noch auftreten können und wahrscheinlich einen Ersatz degenerierender Gliazellen darstellen. Ähnliches gilt für die Teilungsaktivität im Bindegewebe und der Epidermis erwachsener Schnecken. Die Mitosen in den untersuchten Organen juveniler Tiere stehen überwiegend im Dienst der Körper- und Organvolumenzunahme, während die bei adulten Weinbergsschnecken in geringer und unterschiedlicher Zahl festgestellten markierten Zellkerne Teilungen als Ersatz für degeneriertes Zellmaterial darstellen dürften.

**Summary.** It has been demonstrated by injections of H<sup>3</sup>-Thymidine into adult and juvenile snails (*Helix pomatia*) that the mitotic activity in the central nervous system, the connective tissue and epidermis was generally higher in juvenile animals than in adult ones. Data are given for the amount of tritiated thymidine labelled nuclei in the tissues, which are investigated.

D. KUHLMANN

Zoologisches Institut der Universität,  
Abteilung Histophysiologie, Badestrasse 9,  
D-4400 Münster (Deutschland), 30. September 1970.

<sup>1</sup> A. NOLTE und D. KUHLMANN, Z. Zellforsch. 63, 550 (1964).

<sup>2</sup> W. SCHLOOT, Z. Zellforsch. 67, 406 (1965).

<sup>3</sup> D. KUHLMANN, Experientia 25, 848 (1969).

## Inhibition of Novikoff Ascites Cell Transplantation by a Polysaccharide Component in Bull Seminal Plasma

A neutral polysaccharide is present in bull seminal plasma which chemically reacts with and partially degrades tRNA, rRNA, viral RNA and polyuridylic acid<sup>1-3</sup>. Native and denatured DNA are resistant to the polysaccharide. Transfer RNA and rRNA methylation and tRNA aminoacylation were totally inhibited by a 1:3000 dilution of a partially purified deproteinized extract of the seminal plasma. Dilutions of the inhibitor solution as low as 1:500,000 were observed to exert 25% inhibition of enzymatic reactions which utilize tRNA or rRNA as a substrate.

In the present communication, data are presented to show that a similar polysaccharide extract prepared from bull seminal plasma totally inhibits the transplantation of the rapidly growing Novikoff ascites hepatoma.

**Materials and methods.** The Novikoff ascites hepatoma was transplanted intraperitoneally every 7th day (10 ml of ascites fluid/kg). Approximately 50 ml fluid accumulated in the abdominal cavity of each rat, with death resulting in 9–10 days. Whole bull semen collected over liquid nitrogen was kindly supplied by The Eastern Artificial Insemination Corporation, Ithaca, New York.

No antibiotics or preservatives were added to the final pooled sample. Seminal plasma was separated from the sperm cells by centrifugation at 850 × g. Three test solutions were used for injecting the animals. For solution A, a 1:100 dilution of seminal plasma in distilled water was dialyzed against 4 changes of 4 l of water for 24 h at 4°C. For solution B, solid trichloroacetic acid was added to a 1:80 dilution of seminal plasma until the plasma was 7% with respect to acid. After 30 min at 4°C, the deproteinized solution was centrifuged and the supernatant neutralized with concentrated NaOH (final pH 7.4). A final dilution of 1:100 was then dialyzed in the same manner as solution A. For solution C, a 1:80 dilution of deproteinized seminal plasma was

<sup>1</sup> B. SHEID and S. M. WILSON, Biochim. biophys. Acta 224, 382 (1970).

<sup>2</sup> B. SHEID and S. M. WILSON, Arch. Biochem. Biophys., submitted for publication.

<sup>3</sup> B. SHEID and S. M. WILSON, manuscript in preparation.