

Effect of guanidinosuccinic acid on incorporation of tritiated thymidine by normal human peripheral blood lymphocytes (cpm per 10^6 lymphocytes)

Experiment	No additions	Phytohemagglutinin	Phytohemagglutinin and guanidinosuccinic acid
1	65	7,900	1,062
2	85	6,413	1,663
3	45	5,969	1,793
4	168	10,260	1,149
5	43	25,356	13,241
6	12	10,753	6,709
7	83	36,393	29,317
8	46	20,602	16,100
9	64	29,823	13,213
10	150	39,407	20,559
11	132	3,081	1,446
12	6	11,129	9,063
13	127	36,497	23,003
14	90	3,459	1,606
15	22	8,673	5,391

The list of suspected uremic toxins includes 100 or more compounds⁷. From this list, we chose guanidinosuccinic acid (GSA) to study first. GSA is an unusual product of nitrogen metabolism that accumulates in the blood of uremic patients⁸; it is dialyzable, and it is already implicated as a cause of the platelet abnormality associated with uremia⁹. We found that GSA inhibits PHA-stimulated lymphocyte transformation.

For our studies, venous blood was collected in heparinized syringes. The blood was allowed to sit for 3 h to permit erythrocytes to settle out, after which the cell-rich plasma was removed and diluted with tissue culture medium¹⁰ to yield a suspension of 0.75×10^6 lymphocytes per ml. Aliquots of these suspensions were incubated either without any additions, with PHA¹¹, or with GSA¹² in a final concentration of $2.6 \times 10^{-6}M$ and PHA for 105 h at $37^\circ C$ prior to the addition of 1 μCi of tritiated thymidine¹³ per ml of incubation mixture. The incubations were continued for another 18 h and then the cells were harvested by centrifugation at $1400 \times g$ for 10 min. The amount of tritiated thymidine in the DNA of the cell pellet was measured by a previously described method³. The Table summarizes the results.

Our results confirmed the variation that may occur in the incorporation of tritiated thymidine by lymphocytes from different subjects under similar conditions. Nevertheless, it is apparent that GSA inhibited incorporation of

tritiated thymidine in each of the 15 lymphocyte preparations. On the average, 44% inhibition was observed. Higher concentrations of GSA ($2.6 \times 10^{-5}M$ and $2.6 \times 10^{-4}M$) were tried, but they did not increase the extent of inhibition. Perhaps a subpopulation of lymphocytes is resistant to the effect of GSA.

Microscopic examination of lymphocytes incubated in the presence of GSA confirmed that the cells were viable as determined by trypan blue by exclusion and that the extent of transformation was compatible with the extent of incorporation of tritiated thymidine. This is in agreement with observations of others demonstrating that incorporation of tritiated thymidine is an adequate measure of transformation.

GSA is undetectable in serum from normal subjects but is present in high concentration in serum from uremic patients. For a group of 18 uremic patients, COHEN⁸ reports a mean value for serum GSA concentration of $1.6 \times 10^{-4}M$, which is in great excess of the concentration that will inhibit PHA-stimulated transformation of susceptible lymphocytes in vitro. Therefore, we suggest that GSA is one of the compounds responsible for the alteration in cellular immunity associated with uremia.

Zusammenfassung. Guanidinbernsteinsäure hemmt die durch Phytohämagglutinin stimulierte Aufnahme von 3H -Thymidin zu 44%.

R. G. SLAVIN and C. D. FITCH

Department of Internal Medicine,
St. Louis University, 1325 Grand Boulevard,
St. Louis (Missouri 63104, USA), 24 May 1971.

⁷ P. E. TESCHAN, Am. J. Med. 48, 671 (1970).

⁸ B. D. COHEN, Arch. intern. Med. 126, 846 (1970).

⁹ I. M. STEIN, B. D. COHEN and H. I. HOROWITZ, Clin. Res. 16, 397 (1968).

¹⁰ The tissue culture was prepared by diluting 10 ml of TC 199 10 X to 100 ml with sterile, distilled water and adding 500 units of heparin, 10,000 units of penicillin G, and 10 mg of streptomycin. The pH of the medium was adjusted to 7.3 with $NaHCO_3$.

¹¹ To each four milliliters of incubation suspension were added 0.1 milliliter of phytohemagglutinin, PHA-M from Difco Laboratories, Detroit, Michigan.

¹² Purchased from Mann Research Laboratories, New York, New York.

¹³ Specific activity 2.78 mCi per mg, New England Nuclear Corporation.

Aminosäurenanalyse des Ferritins bei primärer und sekundärer Lungenhämosiderose

Die primäre Lungenhämosiderose (LH), die als idiopathische LH¹⁻⁴ und bei gleichzeitiger Glomerulonephritis als Goodpasture-Syndrom (GPS)^{1,4,5} bekannt ist, nimmt im Eisenstoffwechsel eine Sonderstellung ein. So ist insbesondere die Irreversibilität^{2-4,6} des teilweise in die elastischen Fasern des Lungengerüsts inkrustierten Eisens⁷ auffällig. Der Gesamtorganeisengehalt liegt gewöhnlich höher als der bei primärer Siderophilie (Hämochromatose) und der Serumeisengehalt ist erniedrigt. Es wird vermutet, dass eine besondere, möglicherweise mit den sauren Mukopolysacchariden in Zusammenhang stehende

Form der Eisenfixation⁷ vorliegt, weswegen Untersuchungen des Depoteisens Ferritin sinnvoll erscheinen.

¹ R. BÄSSLER und V. DIETEL, Z. Kinderheilk. 79, 328 (1957).

² P. DOERING und H. D. GOTHE, Klin. Wschr. 35, 1105 (1957).

³ P. DOERING, Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. NF 14, 482 (1960).

⁴ H.-N. MACHA und H. -J. BUNGER, Dt. Med. J., im Druck (1971).

⁵ R. P. STEIGER, Dt. med. Wschr. 7, 312 (1967).

⁶ D. KOFFLER, J. SANDSON, R. CARR und H. G. KUNKEL, Am. J. Path. 54, 293 (1969).

⁷ W. CELEN, Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie (Ed. HENKE-LUBARSCHE, Berlin 1931), vol. 3, p. 20.

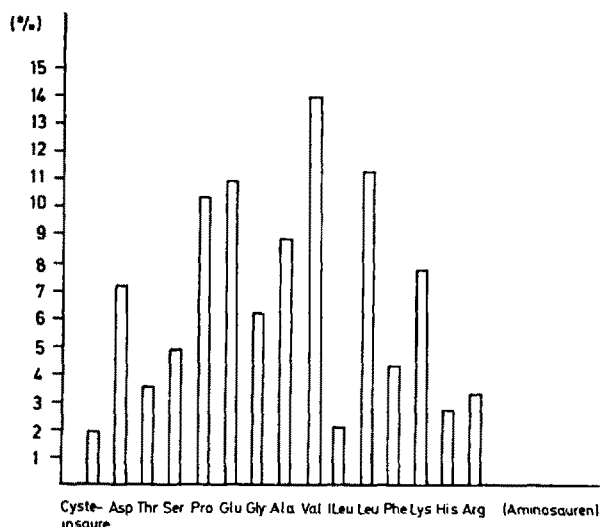


Fig. 1. Prozentualer Aminosäuregehalt des Ferritins aus der Lunge bei Goodpasture-Syndrom.

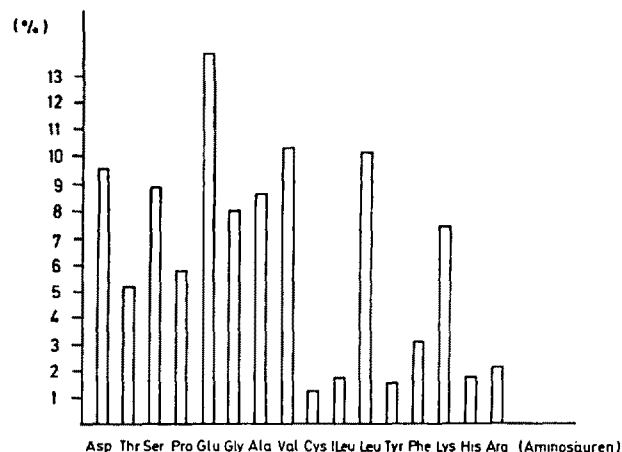


Fig. 2. Prozentualer Aminosäuregehalt des Ferritins aus der Lunge bei kardialer Lungenhämosiderose.

Über die Aminosäurenanalyse des Ferritins bei Lungenhämosiderosen ist unseres Erachtens in der Literatur bislang nichts bekannt.

Material und Methoden. Die Untersuchungen wurden mit Ferritin aus der Lunge bei GPS mit chronischem Verlauf sowie einem Fall von kardialer LH durchgeführt. Diese stellt eine häufige Form der sekundären LH dar. Die Gewinnung des Ferritins erfolgte nach der Methode von GRANICK⁸. Zur Hydrolyse wurde jeweils 0,1 ml der Proben mit 3 ml 6N HCl in 5 ml-Ampullen gefüllt, 1 min mit N₂ angereichert und nach Zuschmelzen 24 h bei 110°C erhitzt. Anschließend konnten die Proben im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt werden, wobei der Rückstand zwischenzeitlich mehrmals zur Eliminierung der Säure mit aqua bid. gelöst wurde. Die Auftragung auf die Säule erfolgte in 10 ml Na-Citrat-Puffer pH 2,2. Wir

benutzten den automatischen Aminosäurenanalyser BC-200 (Biocal Instrument München). Für die sauren und neutralen AS kam der Puffer A (pH 3,19) bzw. B (pH 4,25) und für die basischen AS der Puffer D (pH 5,28) (Pufferkonzentrate der Fa. Biocal) zur Anwendung. Flow rate: 80 ml Puffer/h, 40 ml Ninhydrin/h.

Ergebnisse. Die Figur 1 zeigt den prozentualen AS-Gehalt des Ferritins bei GPS, die Figur 2 den bei kardialer LH. Dabei fällt im Ferritin bei GPS die Cysteinsäure auf, im Ferritin bei kardialer LH Cystin in geringer Konzentration. Darüber hinaus findet sich kein grundsätzlicher Unterschied. Beiden gemeinsam ist das Fehlen des Methionins.

Diskussion. Der auffälligste Befund liegt im Nachweis der Cysteinsäure im Ferritin der Lunge bei GPS. Im intermediären Stoffwechsel stellt die Cysteinsäure bekannterweise ein Zwischenprodukt bei der Entstehung von Taurin aus Cystein dar. Die unterschiedliche AS-Zusammensetzung darf als Hinweis auf eine besondere Form des Ferritins gedeutet werden. In diesem Zusammenhang gewinnen eigene Untersuchungen des stärkegelelektrophoretischen Verhaltens von Ferritin aus der Lunge bei GPS und bei kardialer LH⁹ Bedeutung. Dabei zeigte sich nämlich, dass Ferritin aus der Lunge bei GPS nur in der sogenannten α -Fraktion erschien, wobei Ferritin sonst in drei Fraktionen trennbar ist^{9,10}. Es wäre also durchaus denkbar, dass es organspezifische Eigenschaften des Ferritins gibt, die in diesem Falle möglicherweise mit der besonderen Fixationsform in der Lunge zusammenhängen. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass die Cysteinsäure als guter Komplexbildner mit Metallen bekannt ist.

Ferritin erweist sich nicht nur in der Stärkegel- und Polyacrylamidgelelektrophorese als heterogen^{9,10}, sondern auch im immunologischen Verhalten^{10,11}. Da selbst homologes Ferritin verschiedener Organe in seinem physikochemischen Verhalten nicht einheitlich ist¹², halten wir eingehendere Untersuchungen des Ferritins für sinnvoll, da möglicherweise weitere für die Pathophysiologie der Lungenhämosiderosen wesentliche Kriterien gefunden werden können¹³.

Summary. Amino-acid composition of the ferritin from lungs in a case of Goodpasture's syndrome, as well as cardiac pulmonary hemosiderosis, was examined. Ferritin in the case of Goodpasture's syndrome was found to contain cysteineic-acid, the significance of which is discussed.

H.-J. BUNGERT

Medizinische Klinik und Poliklinik im Klinikum Steglitz der Freien Universität, Hindenburgdamm 30, D-1 Berlin 45 (Deutschland), 10. Mai 1971.

⁸ S. GRANICK, Chem. Rev. 38, 379 (1946).

⁹ H.-J. BUNGERT, H. LEONHARDT und H. N. MACHA, Clin. chim. Acta 32, 385 (1971).

¹⁰ I. M. FINE und G. HARRIS, Clin. chim. Acta 8, 794 (1963).

¹¹ G. W. RICHTER, Br. J. exp. Path. 45, 88 (1963).

¹² Th. G. GABUZDA und J. PEARSON, Nature, Lond. 220, 1235 (1968).

¹³ Für die freundliche und stets zuverlässige Mitarbeit sei der Biochem. techn. Ass. Fräulein ILSE STELTER bestens gedankt.