

the effectiveness of amidephrine, makes it almost certain that α -receptors are concerned although the possibility that β -receptors could contribute to the hyperpolarization, or even to underlie it under certain circumstances, has not been excluded.

Twenty-four hours after isolation the sensitivity of the cells to adrenergic amines had fallen 5–10-fold to a level which was retained for at least the following 2 days, although the maximum response attainable seemed to have declined. It was found that the large pulses of drugs needed to produce any effects now sometimes caused the membrane potential to become unstable, and on occasion to oscillate. An extreme example is shown in Figure 2D which was recorded from a 2-day-cell 2–3 min after a series of pulses of (–)-isoprenaline (up to 10^{-7} A for 500 msec) each of which had produced only slight increases in membrane potential. The mechanism involved both in this response and in the fall in sensitivity with time remain to be studied.

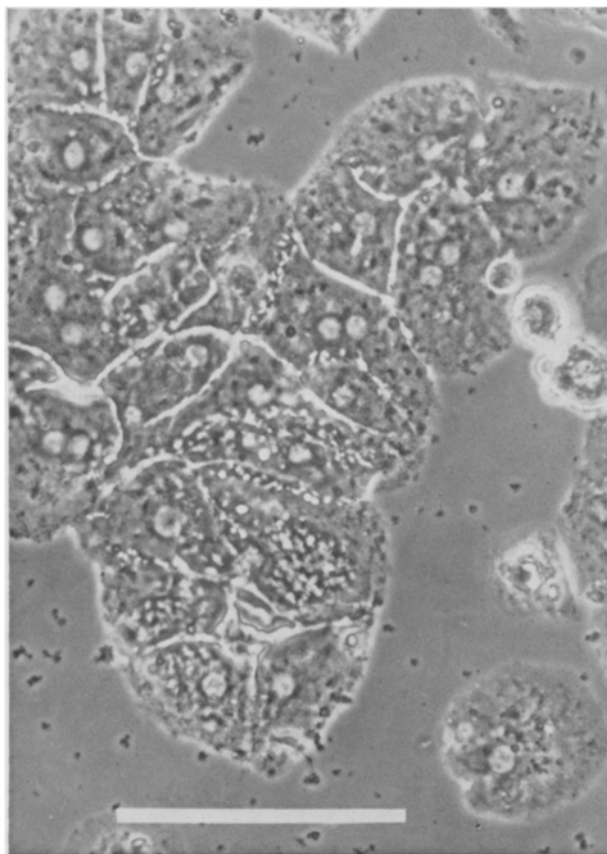


Fig. 1. Phase contrast photomicrograph of culture of parenchymal cells after approximately 22 h incubation (100 μ m inset).

In summary, the present results show that it is possible to examine the electrical responses of isolated guinea-pig liver cells, maintained in short term tissue culture, to iontophoretically applied catecholamines. It is hoped that this approach may prove of value in the further study of the mechanism of action of catecholamines at the cellular level^{10,11}.

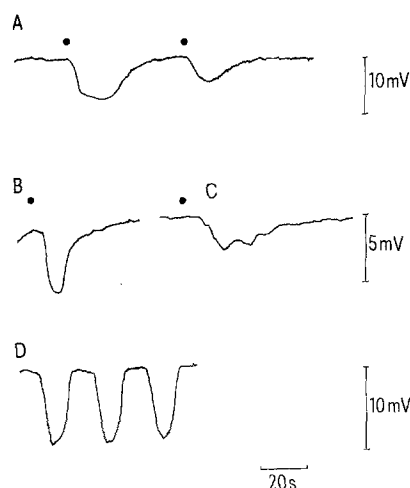


Fig. 2. Effect of iontophoretically applied adrenergic agonists on the membrane potential of parenchymal cells in tissue culture: A) Effect of (–)-noradrenaline (3.5×10^{-7} A for 50, then 25 msec) on a binucleate cell in a 6–8-h-old culture. B) and C) Effect of (\pm)-amidephrine (B) 3×10^{-7} A, 50 msec; C) 9×10^{-7} A, 50 msec in a 6–8-h culture. D) Oscillatory potential recorded 2–3 min after large pulses of (–)-isoprenaline had been applied to a cell in a 2-day-old culture. Room temperature throughout.

Zusammenfassung. Mit Hilfe der intrazellulären Mikroelektrodenteknik wird gezeigt, dass Parenchymzellen der Meerschweinchenleber in der Gewebekultur hyperpolarisieren, wenn sympathomimetische Drogen ionophoretisch appliziert werden.

R. D. GREEN¹², M. M. DALE and D. G. HAYLETT

Department of Pharmacology, University College London, Gower Street, London WC 1 (England), 16 March 1972.

¹⁰ We would particularly like to thank Dr. D. H. JENKINSON for advice and helpful criticism.

¹¹ This work was supported in part by a research grant from the Cancer Research Campaign.

¹² Present address: Department of Pharmacology, University of Illinois at the Medical Center, Chicago (Illinois, USA).

Zytophotometrische Untersuchungen an normalen Lymphknotenzellen des Schafes¹

Die Zytophotometrie hat in den vergangenen Jahren in der Tumorphathologie vermehrt Anwendung gefunden. Durch Vergleich der Kern-DNS-Werte der Tumorzellen mit denen einer normalen Zellpopulation wird versucht, eine Aussage über die Charakteristik der Geschwulst zu treffen (SCHIEMER², SANDRITTER et al.^{3,4}; SEIDEL et al.⁵; SANDRITTER^{6–8}).

Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über eine bei Schafen enzootisch auftretende lymphatische Leukose^{9,10} interessierte vor allem auch die praktisch wichtige Frage, ob auf zytophotometrischem Wege die «Leukosezellen» von normalen lymphatischen Zellen unterschieden werden können. Als erster Schritt zur Beantwortung dieser Frage werden die oben genannten Metho-

den an Lymphozytenpopulationen aus Lymphknoten von vier normalen Schafen angewendet.

Material und Methoden. Bei den 4 etwa 1 Jahr alten, klinisch gesunden und pathologisch-anatomisch unauffälligen Schafen wurden von den ca. 15 min nach dem Tod entnommenen Mesenteriallymphknoten Abklatschpräparate auf reinweissen Objektträgern angefertigt (Lufttrocknung 5 min; Fixierung 75 min in einem Methanol-Formalin(36%)-Eisessig-Gemisch, 85:10:5, Wässerung 25–30 min). Die Feulgen-Reaktion erfolgte für alle Präparate gleichzeitig nach der von BÖHM¹¹ angegebenen Methode.

Die Messung erfolgte mit dem Universal-Mikrospektrophotometer (UMSP) mit Schnellmesszusatz und angeschlossener EDV-Anlage (PDP 12); Objektiv 100×, n.A. 1,25; Messpunkt 0,5 µm; Leuchtfeldblende 3 µm; Wellenlänge 560 nm.

Das Präparat wird mit einer Geschwindigkeit von 50 Einzelschritten pro sec zeilenweise bewegt. Der Abstand der Einzelschritte beträgt 0,5 µm, die (horizontale) Zeilenlänge, je nach Kerndurchmesser 9–15 µm, der Zeilenhub (= Abstand zweier Zeilen) 0,5 µm. Von jedem Präparat kamen mindestens 100 Zellkerne zur Auswertung. Sämtliche so über der durchwanderten Fläche ermittelten Extinktionswerte wurden auf Magnetband gespeichert. Die Summe dieser Werte, welche ein relatives Mass für die Farbstoffmenge und damit für den zu ermittelnden DNS-Gehalt darstellt, wurde sowohl vom Schnellmesszusatz als auch von der EDV-Anlage ausgedruckt. Die gefundenen Summen werden als Arbeitseinheiten (AE) bezeichnet. Diese Werte wurden zur Erstellung des Histogramms verwendet. Weiterhin wurden (bei 3 Tieren) für jeweils 63 Zellkerne die Summenwerte bei verschiedenen Extinktionsniveaus ausgedruckt, wobei als Minimalschwelle nur Einzelmessungen $E > 0,02$ zur Auswertung gelangten. Um einen Vergleich mit früheren Untersuchungen¹² zu ermöglichen, wurden die von den PDP 12 gelegten Extinktionsschwellen nachträglich in die entsprechenden Niveaubereiche der Absorptionswerte umgerechnet.

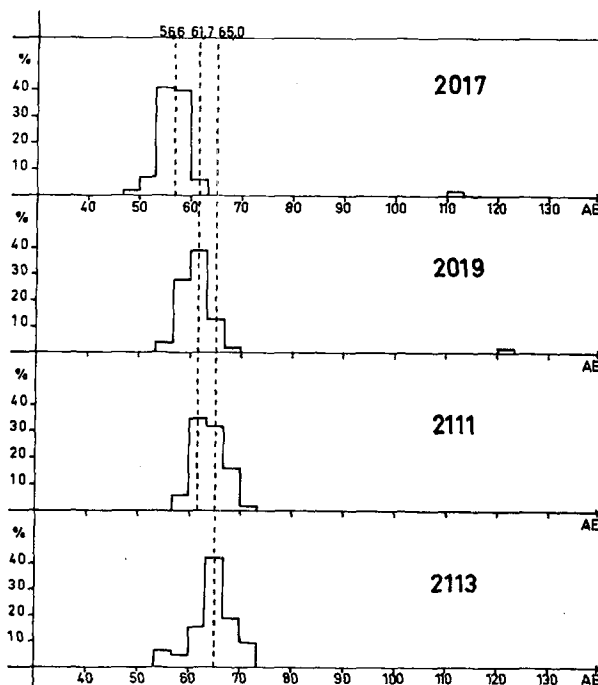


Fig. 1. DNS-Histogramme der Lymphknoten Zellen von 4 normalen Schafen.

Bei der Errichtung normierter Absorptionsniveaueurven wurden nur die vermutlich in der G_1 -Phase befindlichen Zellen berücksichtigt. Der G_1 -Wert wurde nach der Aufstellung des Histogramms ermittelt. Aus den betreffenden Werten eines Falles kamen ausschliesslich die arithmetischen Mittelwerte zur Aufzeichnung. Die für die Absorptionsniveaueurven zugrunde gelegten Werte werden auch für die statistische Auswertung benützt. Dabei wird die gegenseitige Abgrenzbarkeit im Student-t-Test errechnet ($\alpha = 0,025$)¹³.

Ergebnisse. 1. Bestimmung des Gesamt-DNS-Gehaltes. Das Verteilungsdiagramm der Gesamtwerte zeigt bei allen Schafen eine deutliche Gruppierung um einen Gipfelwert, der mit dem Durchschnittswert der G_1 -Population identifizierbar sein dürfte (Figur 1). Dieser beträgt bei Schaf Nr. 2017 56,6 AE, bei Schaf Nr. 2019 und Nr. 2111 61,7 AE und bei Schaf Nr. 2113 65,0 AE. Die Gruppierung der anderen G_1 -Werte um den Modalwert ist bei Schaf Nr. 2017 und Nr. 2113 nahezu symmetrisch, bei Nr. 2019 ist eine deutlich negative Schiefe, bei Nr. 2111 eine positive Schiefe zu erkennen. Letztere leitet vermutlich bereits zu Zellen der S-Phase über. Bei Fall Nr. 2017 und Nr. 2019 treten je 2% Messwerte zwischen 110 und 123 AE auf. Diese Werte können mit Zellen der G_2 -Phase identifiziert werden.

2. Absorptionsniveaueurven mit Normierung der Koordinatenschnittpunkte. Die Absorptionsniveaueurven der drei untersuchten Lymphozytenpopulationen zeigen unterschiedliche Positionen im Diagramm (Figur 2). Nach einem unterschiedlich ausgedehnten steilen Anstieg erfolgt ein mehr oder weniger gradliniger Verlauf bis zum Ordinatenschnittpunkt. Dementsprechend unterschiedlich ist die Verteilung der DNS-Abnahme. Während wir bei einer Niveauschwelle von 60% aller Absorptionswerte bei Nr. 2019 eine Abnahme des Gesamt-DNS-Gehaltes um ca. 36% beobachten können, beträgt bei derselben Schwelle die DNS-Abnahme bei Nr. 2113 nur ca. 20% und bei Nr. 2111 schliesslich nur ca. 10%. Demzufolge besteht allgemein eine starke Betonung der hohen Absorptionsbereiche an der Bildung des Gesamt-DNS-Gehaltes. Damit bildet der Absorptionsbereich von 60–100% bei Nr. 2019 64% des Gesamt-DNS-Gehaltes, bei Nr. 2113 ca. 80% und bei Nr. 2111 schliesslich sogar 90% des Gesamt-DNS-Gehaltes. Die Divergenz der Kurvenläufe wurde für die nahezu gradlinig verlaufenden Abschnitte auch mittels linearer Regression objektiv dargestellt. Die Konstanten für die Funktion $y = -ax + b$ waren dabei für Fall Nr. 2111: $a = 10,8$, $b = 80,6$; für Fall Nr. 2113: $a = 12,0$, $b = 77,5$; für Fall Nr. 2019: $a = 9,5$, $b = 63,8$.

¹ Diese Arbeit entstand im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 47 (Virologie) an der Justus Liebig-Universität Giessen.

² H. G. SCHIEMER, Klin. Wschr. 45, 393 (1967).

³ W. SANDRITTER, in *Introduction to Quantitative Cytochemistry* (Ed. G. L. WIED; Academic Press, Chicago 1966).

⁴ W. SANDRITTER, M. CARL und W. RITTER, Acta cytol. 10, 26 (1966).

⁵ A. SEIDEL und W. SANDRITTER, Z. Krebsforsch. 65, 555 (1963).

⁶ W. SANDRITTER, Dt. med. Wschr. 86, 2177 (1961).

⁷ W. SANDRITTER, J. HILWIG, K. ENGELBARTH, G. KIEFER und R. KIEFER, Z. Krebsforsch. 67, 57 (1965).

⁸ W. SANDRITTER, G. KIEFER, G. SCHLÜTER und W. MOORE, Histochemie 10, 341 (1967).

⁹ J. PAULSEN, E. BEST, K. FRESE und R. RUDOLPH, Zbl. Vet. Med. B 18, 33 (1971).

¹⁰ E. WEISS, J. PAULSEN, R. RUDOLPH und R. HOFFMANN, Zbl. Vet. Med. B 18, 244 (1971).

¹¹ N. BÖHM, Histochemie 14, 201 (1968).

¹² W. SCHMAHL, Vet.-Diss. Giessen 1971.

¹³ L. SACHS, *Statistische Auswertungsmethoden* (Verlag Springer, Berlin 1968).

Dadurch ist die unterschiedliche Lage der linearen Regressionslinien im Diagramm ersichtlich.

Statistische Erfassung. Die Abweichung des Kurvenverlaufs von Fall Nr. 2111 gegenüber dem des Falles Nr. 2113 erwies sich im Bereich zwischen $A = 25\%$ und $A = 87,5\%$ als hochsignifikant ($p < 0,001$), desgleichen zwischen Fall Nr. 2111 und Nr. 2019 im Bereich von $A = 12,5 - 62,5\%$. Auch die Abweichung zwischen Fall Nr. 2113 und Nr. 2019 war in den Bereichen $A = 12,5 - 50\%$ und $A = 75 - 100\%$ hochsignifikant ($p < 0,001$).

Histologisch zeigen alle vier untersuchten Lymphknoten einen normalen Aufbau.

Diskussion. Bei dem Vergleich der erhaltenen Ergebnisse zeigt sich sowohl im Histogramm als auch bei den Absorptionsniveaueurven eine beträchtliche Streubreite der zytophotometrischen Messwerte.

In der Literatur wird das Auftreten einer solchen Streuung an bestimmten Geweben innerhalb einer Tiergattung gelegentlich beschrieben^{14,15}. Zum Teil wurde dies als eine tatsächlich vorliegende Variation auf Grund erhöhter Stoffwechselaktivität in verschiedenen Zellpopulationen interpretiert^{16,17}, zum Teil wurde die Bedeutung der von der DNS-Konstanz abweichenden Befunde vollkommen verneint und auf Messfehler zurückgeführt^{17,18}. Es sind ausserdem auch präparative Ungenauigkeiten bei der

Herstellung, Fixierung und Färbung in Betracht zu ziehen, die trotz gleicher und gleichzeitiger Behandlung unwillkürlich auftreten können¹⁹.

Bei den von uns untersuchten Schaflymphknoten ist die Möglichkeit eines präparativen Fehlers sowohl durch eine rasche und gleichzeitige Herstellung als auch durch die stets gleichzeitige weitere Behandlung der Präparate auf ein Minimum reduziert worden. Dadurch wird deutlich, dass die hier aufgezeigten Schwankungen zwischen den Normalpopulationen weitgehend von der Behandlung unabhängig sind und demnach bei vergleichenden Untersuchungen berücksichtigt werden müssen. Vergleicht man die hier gefundenen Ergebnisse mit entsprechenden Untersuchungen an leukotisch veränderten Lymphknoten¹², so zeigen letztere eine ähnlich breite Streuung der Messwerte wie die Ergebnisse aus der Normalpopulation. Eine exakte Interpretation erscheint daher nicht möglich. Aus diesem Grund erachten wir bei zytophotometrischen Untersuchungen die Kontrolle mehrerer Normalpopulationen als unbedingt notwendig.

Summary. Cytophotometric investigations of lymphocytic populations of 4 sheep were carried out to determine the diploid standard value for comparative investigations of lymph node cells from sheep with lymphatic leucosis. In spite of exact and simultaneous preparation there were marked and significant differences in the histograms as well as in the diagrams of absorption level separation. Therefore, the control of several normal cell populations is essential before starting cytophotometric investigations of neoplastic cells.

W. SCHMAHL, R. HOFFMANN und E. WEISS

Veterinär-Pathologisches Institut der
Justus-Liebig-Universität,
Frankfurter Strasse 94, D-6300 Giessen (Deutschland),
17. März 1972.

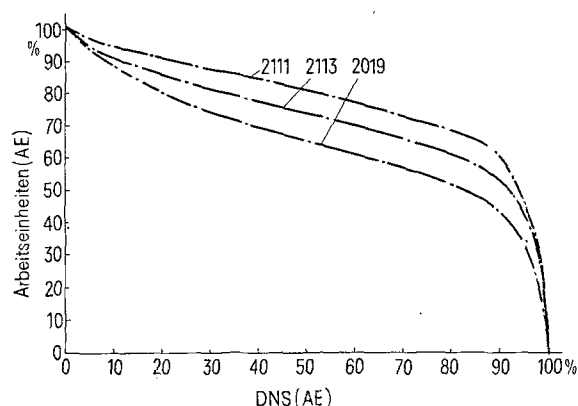


Fig. 2. Normierte Absorptionsniveaueurven (arithmetische Mittelwerte).

¹⁴ M. P. VIOLA-MAGNI, J. Cell Biol. 25, 415 (1965).

¹⁵ H. ROELS, Int. Rev. Cytol. 19, 1 (1966).

¹⁶ S. R. PELC, Expl. Geront. 5, 217 (1970).

¹⁷ M. ALPERT und H. SWIFT, Expl. Cell Res. 5, 455 (1953).

¹⁸ K. PATAU und H. SWIFT, Chromosoma 6, 149 (1953).

¹⁹ C. LEUCHTENBERGER, in *General Cytochemical Methods* (Ed. J. F. DANIELLI; Academic Press, New York 1958), vol. 1.

Effects of Ethylnitrosourea on the Development of Brain

DRUCKREY¹⁻³ and his associates, in their pioneering studies on experimental brain tumors, have shown that administration of Ethylnitrosourea (ENU) to pregnant rats produces brain tumors in the offsprings of these animals. These investigations strongly suggest that ENU can reach the developing embryos in rats transplacentally. From neuroembryological viewpoint this technique provides a valuable experimental tool for the study of neuroembryogenesis in the rat.

Laboratory-bred Wistar albino rats were administered ENU i.v. between days 14 and 21 of gestation (dose: 60 mg/kg body weight). On each day of gestation at least 1 animal was injected with the chemical. From each litter born to these animals 2 pups each were sacrificed on days 1, 3, 10, 15, 21 and 75 after their birth.

On macroscopic examination it was found that the overall size of most of the brains was smaller than that of normal brains of the same age, and this suggested that ENU had interfered with the normal development of the central nervous system. Cerebral cortex and cerebellum were consistently affected, and brain stem and olfactory bulbs did not appear affected. When the brains from all the animals of 21 days age were placed in a series and

¹ H. DRUCKREY, S. IVANKOVIČ and R. PREUSSMANN, Nature, Lond. 210, 1378 (1966).

² S. IVANKOVIČ, H. DRUCKREY and R. PREUSSMANN, Naturwissen 53, 410 (1966).

³ S. IVANKOVIČ and H. DRUCKREY, Z. Krebsforsch. 71, 320 (1968).