

Results. DMPH₄ (10^{-3} M) consumed O₂ at both pH 6.5 and 7.4 (Table, note the higher initial rate of O₂ consumption at pH 7.4). The addition of SOD caused a significant ($p < 0.005$) inhibition in the rate of O₂ consumption at both pH 6.5 and 7.4. Boiled SOD had no effect on the rate of O₂ consumption. These data indicated that O₂⁻ was formed from DMPH₄ and that it catalyzed the autoxidation of DMPH₄.

It is known that O₂⁻ can reduce cytochrome c¹. In separate experiments at pH 7.4, we found that 10 µg/ml SOD caused a 33% inhibition in the initial rate of reduction of 10^{-5} M cytochrome c by 5×10^{-6} M DMPH₄ (data based on absorbance change at 550 nm between 15 and 30 sec). This result confirmed that O₂⁻ was generated from DMPH₄.

Discussion. In a recent report, NISHIKIMI⁷ indicated that SOD inhibited the DMPH₄ mediated reduction of nitro blue tetrazolium as well as the rate of autoxidation of DMPH₄ as measured spectrophotometrically at 330

nm. These data further confirm the formation of O₂⁻ from DMPH₄. NISHIKIMI⁷ also reported that the naturally occurring pteridine cofactor, tetrahydrobiopterin, generated O₂⁻.

The absolute requirement for pteridine cofactors in tyrosine hydroxylase systems, as well as the known capacity of these cofactors to autoxidize suggest that some species generated during the autoxidation of pteridines is essential for tyrosine hydroxylase activity. In spite of the failure of SOD to inhibit tyrosine hydroxylase activity², it is still possible that O₂⁻ is essential for hydroxylation. Failure of SOD to inhibit might be explained by an inability of SOD to come into contact with O₂⁻ generated at the active site of tyrosine hydroxylase. The data of PETRACK and CHERTOCK² indicate that O₂⁻ (or some species derived from O₂⁻ like the hydroxyl radical or singlet oxygen) can inactivate tyrosine hydroxylase. Perhaps therefore, the well known substrate inhibition seen with excess DMPH₄ in tyrosine hydroxylase assay systems⁸ is due at least partially to O₂⁻ generated from DMPH₄.

Zusammenfassung. Es werden neue Befunde beigebracht, die für die Bildung von Superoxyd-Radikal durch DMPH₄, ein biologisch wichtiges Pterinderivat, sprechen.

R. E. HEIKKILA and G. COHEN⁹

Mount Sinai School of Medicine,
Department of Neurology, 5th Avenue at 100 th Street,
New York (N.Y. 10029, USA), 8 October 1974.

The effect of superoxide dismutase (SOD, 100 µg) on the initial rate of oxygen consumption by DMPH₄ (10^{-3} M)

pH	O ₂ consumption (nmoles O ₂ /min)		Inhibition (%)
	- SOD	+ SOD	
6.5	47 ± 8 (5)	30 ± 1 (5)	36
7.4	62 ± 9 (5)	36 ± 6 (5)	42

Data are the mean ± S.D. of the initial rate of O₂ consumption (nmoles O₂/min); the number of determinations are in brackets. Experiments were run in 1 ml of Krebs-Ringer phosphate buffer at pH 7.4 or 0.05 M sodium acetate buffer at pH 6.5.

⁷ M. NISHIKIMI, Fedn. Proc. 33, 1256 (1974).

⁸ W. N. POILLON, J. Neurochem. 21, 729 (1973).

⁹ This work was supported by the Clinical Research Center for Parkinsons and Allied Diseases and USPHS Grant No. NS-05184.

Sur l'effet multipolarisant de la vinblastine dans la division cellulaire d'*Allium cepa* L.

La vinblastine (vincalécoblastine ou VLB), alcaloïde isolé de la *Vinca rosea* L. (*Catharanthus roseus* G.) est un agent cytostatique connu et utilisé dans la thérapie de diverses tumeurs^{1,2}. Les études cytologiques réalisées sur des cultures de tissus animaux^{3,4} et des cellules végétales⁵ exposées à la VLB, aboutirent à la conclusion que cet alcaloïde, aussi bien in vivo qu'in vitro, exerçait son action sur le processus mitotique, à la manière de la colchicine, en bloquant la division cellulaire au niveau de la métaphase, par interférence avec la formation du fuseau mitotique.

Dans cette étude, nous avons analysé l'effet de la VLB sur le fonctionnement du fuseau de cellules végétales en division, en suivant la cinétique de production des figures multipolaires, après le traitement opéré avec cet agent mitostatique.

Nous avons utilisé des méristèmes radiculaires d'*Allium cepa* L. Les bulbes sont mis à germer dans l'eau aérée, à 25°C et à l'obscurité. Les racines sont traitées par une solution aqueuse de sulfate de vinblastine (Lilly) à 0,02%, pendant 15 min, et remises ensuite dans l'eau. Les observations sont effectuées sur plusieurs racines fixées

¹ I. S. JOHNSON, H. F. WRIGHT, G. H. SVOBODA and J. VLANTIS, Cancer Res. 20, 1016 (1960).

² J. G. ARMSTRONG, R. W. DYKE, P. J. FOUTS and J. E. GAHMER, Cancer Chemother. Rep. 78, 49 (1962).

³ G. G. PALMER, D. LEVINGOOD, A. K. WARREN, P. J. SIMPSON and I. S. JOHNSON, Expl Cell Res. 20, 198 (1960).

⁴ D. AFRA and L. GAZSÓ, Therapia hung. 78, 1 (1970).

⁵ G. DEYSSON and R. TRUHAUT, C.r. Acad. Sci., Paris 257, 3512 (1963).

Action de la vinblastine sur l'activité mitotique des cellules méristématiques d'*Allium cepa* L.

Heures après le traitement	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Index mitotique*	9,7	13,0	11,5	13,8	12,1	11,0	12,9	11,2	10,2

* mitoses pour 100 cellules.

dans l'éthanol-acétique 3:1 à intervalles d'1 h puis, à la fin du traitement, colorées à l'orcéine acétique-chlorhydrique et écrasées⁶.

L'index mitotique (exprimé comme pourcentage de cellules méristématiques en division) et l'index d'anaphases (pourcentage de cellules en anaphase par rapport aux cellules en division) sont calculés par l'examen de 500 à 1000 cellules de chaque préparation⁷. Le nombre d'anaphases (pourcentage de cellules en anaphase dans la population méristématique) est établi par la combinaison des paramètres antérieurs⁸.

Après le traitement de 15 min, l'index mitotique se trouve inférieur aux valeurs considérées comme normales (13 ± 2) pour ce matériel⁷, et c'est aussi dans les dernières heures d'observation que des niveaux bas sont obtenus (Tableau). D'autre part, depuis la fin du traitement par la VLB, l'on observe des mitoses normales à côté de figures mitoclasiques (c-métaphases, mitoses multipolaires, etc.).

Dès la cessation du traitement, l'index d'anaphases est augmenté par rapport aux témoins ($9,5 \pm 2$)⁷, atteignant au maximum du 16,6% à la 3^e h. Le nombre d'anaphases atteint aussi un maximum à la 3^e h, avec une valeur de 2,3%; ceci indique une élévation de la fréquence des cellules en anaphase, produite par la drogue (Figure 1). La fréquence d'anaphases multipolaires (par rapport à la fraction de la population qui traverse la période anaphasique) atteint un maximum (44,1%) à la 2^e h, pour régresser ensuite (Figure 2).

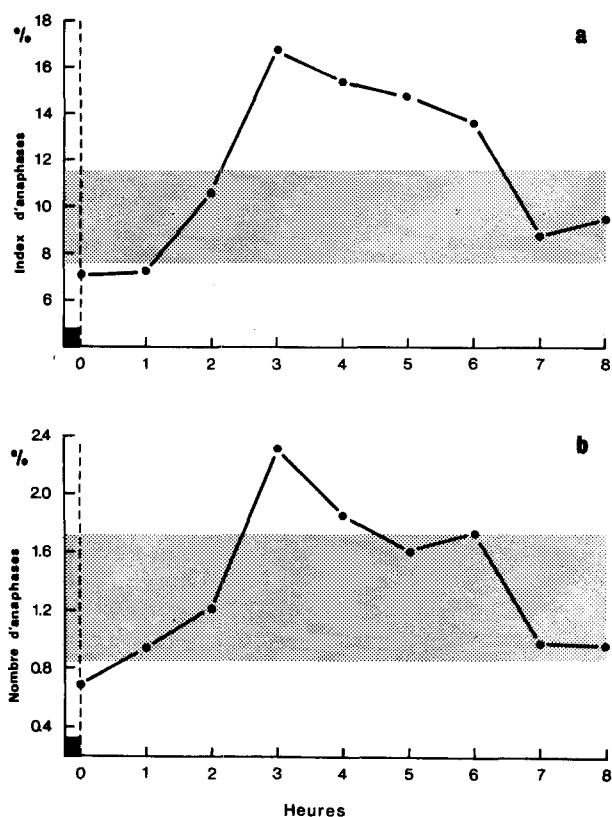


Fig. 1. L'index d'anaphases (a) et le nombre d'anaphases (b) après la cessation du traitement avec la vinblastine à 0,02%. Les aires pointillées représentent les variations habituelles de ces paramètres dans les méristèmes radiculaires d'*Allium cepa*.

La dynamique de l'effet multipolarisant dans la population méristématique est exprimée par un nouveau paramètre, obtenu par la combinaison des paramètres antérieurs⁹. Comme le montre la Figure 2, après un maximum de 0,74%, l'abaissement de cette fréquence s'accroît graduellement.

Des études biochimiques ont démontré que la VLB a un effet inhibiteur sur la synthèse d'acides nucléiques^{10, 11}. Celui-ci pourrait être mis en relation avec la diminution graduelle de l'activité mitotique dans notre système à la suite de l'interruption du traitement, ce qui semble indiquer un effet prolongé de la drogue sur le métabolisme cellulaire.

Divers travaux d'ultrastructure^{12, 13} ont signalé que l'effet mitoclasique de la VLB est dû à la destruction de l'organisation fibreuse du fuseau. La capacité de cette

- ⁶ J. H. TJIO and A. LEVAN, Ann. Estac. exp. Aula Dei 2, 21 (1951).
⁷ J. F. LÓPEZ-SÁEZ and M. E. FERNÁNDEZ-GÓMEZ, Experientia 27, 591 (1965).
⁸ G. GIMÉNEZ-MARTÍN, A. GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. DE LA TORRE and M. E. FERNÁNDEZ-GÓMEZ, Experientia 27, 972 (1971).
⁹ J. P. HERVÁS and G. GIMÉNEZ-MARTÍN, Cytobiologie 9, 233 (1974).
¹⁰ W. A. CREASEY and M. E. MARKIW, Biochim. biophys. Acta 87, 601 (1964).
¹¹ J. P. G. WILLIAMS, Cell Tissue Kinet. 3, 155 (1970).
¹² L. J. JOURNEY, J. BURDMAN and P. GEORGE, Cancer Chemother. Rep. 52, 509 (1968).
¹³ J. F. MESQUITA, Doutorado em Biologia. Coimbra (1970).

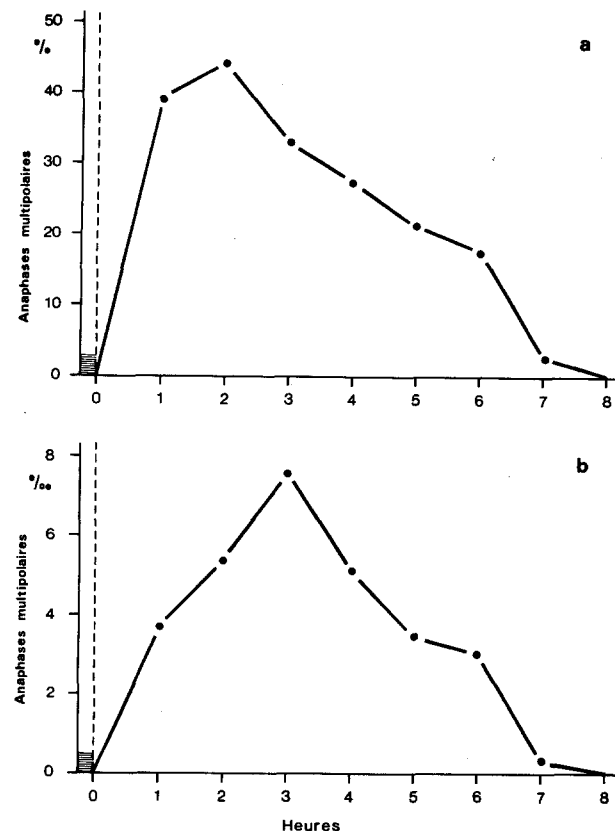


Fig. 2. Evolution de la multipolarité cellulaire dans les méristèmes, après l'interruption du traitement avec la vinblastine à 0,02%. a) pourcentage de multipolarité chez les cellules anaphasiques; b) fréquence d'anaphases multipolaires (%) dans la population méristématique.

drogue de dépolymériser les microtubules cytoplasmiques est une conséquence de son affinité envers les protéines microtubulaires^{14,15}. Nos résultats indiquent en outre une scission des pôles du fuseau dans des cellules où la concentration de VLB n'atteint pas le niveau nécessaire à la complète destruction de l'appareil mitotique (blocage en métaphase).

La production d'anaphases multipolaires pendant le temps qui suit la cessation du traitement montre le progrès des cellules multipolaires au travers de la mitose;

le retrait de la drogue permet à ces cellules d'échapper à la totale désorganisation de leur fuseau mitotique (c-métaphase).

Nous pensons que l'étude de la capacité multipolairisante de la VLB, après des traitements de courte durée, peut avoir de l'intérêt lors des applications pratiques de cette drogue dans la chimiothérapie anticancéreuse.

Summary. The effect of vinblastine on the cell anaphasic polarity in onion root meristems of *Allium cepa* L. has been studied. Multipolar anaphases production during recovery in tap water has been observed and its kinetic pattern established.

J. P. HERVÁS

¹⁴ S. E. MALAWISTA, H. SATO and K. G. BENSCH, *Science* 160, 770 (1968).

¹⁵ R. MARANTZ, M. VENTILLA and M. SHELANSKI, *Science* 165, 498 (1969).

Departamento de Citología, Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona (Espagne), 2 August 1974.

Structure and Permeability of Junctions in Phytohemagglutinin Stimulated Human Lymphocytes

Specialized membrane junctions provide a direct pathway for intercellular communication in several tissues^{1,2}. Gap-junctions have been found in several instances where electrotonic coupling was detected, but evidence indicating this structure as the site of low intercellular resistance is not conclusive². An important correlation between ionic permeability and junctional structure has been described by GILULA et al.³ in cultured Chinese hamster cells where gap junctions occurred only when high transjunctional permeability was also observed. More direct evidence has just been found by AZARNIA et al.⁴ in a line of human cells where both intercellular communication and gap junctions were detected. When these cells were fused with a mouse cell line that has no electrotonic coupling and no gap junctions, a segregant non-coupling cell line was obtained, in which no gap-junctions were detected.

Human lymphocytes stimulated by the plant-derived mitogen phytohemagglutinin (PHA) form junctions of high permeability⁵. Increase of cell density enhances the mitotic activity induced by PHA-stimulation⁶, a

¹ W. R. LOEWENSTEIN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 137, 441 (1966).

² M. V. L. BENNETT, *Fedn. Proc.* 32, 65 (1973).

³ N. GILULA, R. REEVES and A. STEINBACH, *Nature, Lond.* 235, 262 (1972).

⁴ R. AZARNIA, W. J. LARSEN and W. R. LOEWENSTEIN, *Proc. natn. Acad. Sci., USA* 71, 880 (1974).

⁵ G. M. OLIVEIRA-CASTRO, M. A. BARCINSKI and S. CUKIERMAN, *J. Immun.* 111, 1616 (1973).

⁶ J. H. PETERS, in *Lymphocyte Recognition and Effector Mechanisms* (Eds. K. LINDAHL-KISSLING and D. OSOBA; Academic Press, New York 1974), p. 13.

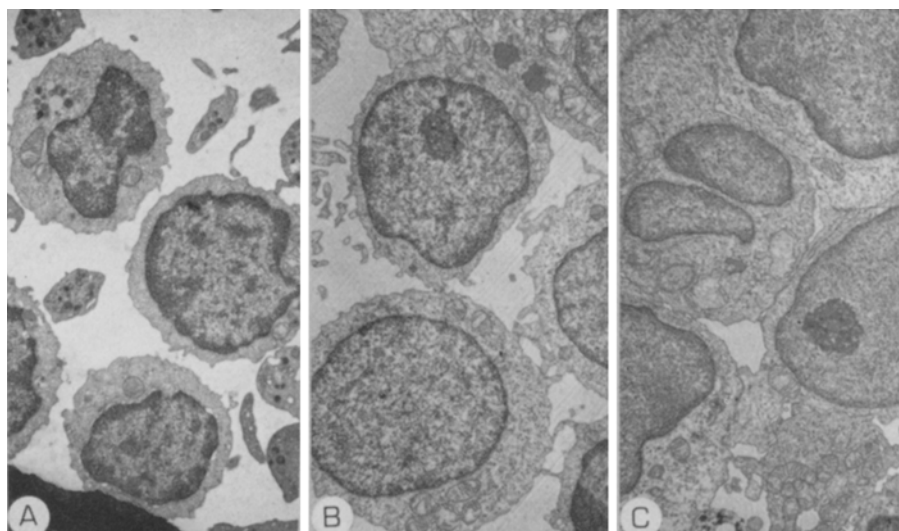


Fig. 1. Lymphocyte cultures after different periods of stimulation by PHA. $\times 3,200$. A) Control culture after 24 h of incubation without PHA. Note that no cell contacts are seen. B) Culture after 24 h of incubation with PHA. Several contacts between the stimulated cells are present. C) Culture after 65 h of incubation with PHA. All the cells are in contact and the culture has a tissue-like appearance.