

Osmolarität sind in der Tabelle und in den Figuren 1–5 dargestellt.

Diskussion. Plasmaviskosität. Ziel der Flexibilitätsmessungen sollte es sein, objektiv reproduzierbare Methoden, die allein die Verformbarkeit der Einzelerthrozyten messen, zu suchen. Die Ergebnisse über die Abhängigkeit der Plasmaviskosität zeigen insbesondere beim Fibrinogen und Gamma-Globulin, dass die Plasmaviskosität bzw. das Suspensionsmedium die Messung der Erythrozytenverformbarkeit bzw. die -filtrabilität mit beein-

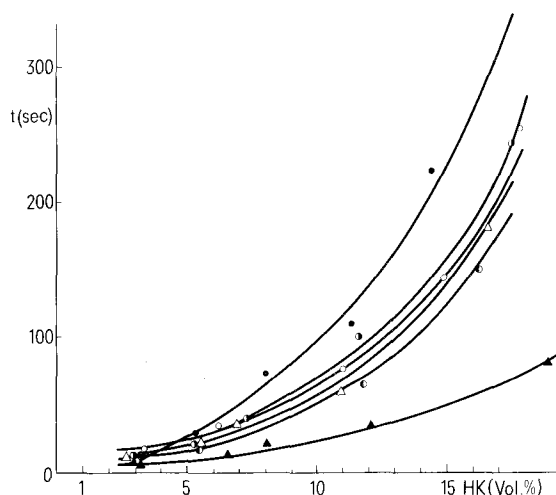


Fig. 4. Veränderung der Erythrozytenfiltration in Abhängigkeit der Erythrozytenanzahl, dargestellt am Hämatokrit.

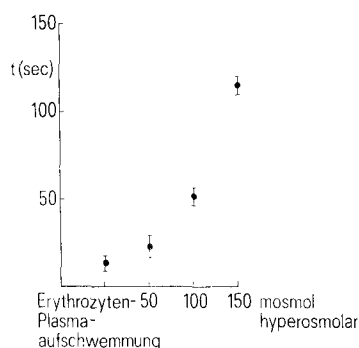


Fig. 5. Veränderung der Erythrozytenfiltration in Abhängigkeit der Osmolarität.

flusst. Überlegungen hierzu könnten auf einen Schmier-effekt der Plasmaproteine hindeuten, die es den Erythrozyten z.B. bei einer bestimmten Konzentration eines Plasmaanteils unabhängig von ihrer Verformbarkeit ermöglichen, schneller und besser durch die Poren zu treten.

Auch aus messtechnischen Gründen muss auf die Bedeutung der Viskosität des Suspensionsmediums hingewiesen werden, da bei zu niedriger Viskosität dieses schneller durch die Filter gepresst wird und es zu einer relativen Erythrozytenvermehrung im Restfiltrat und damit zu einer relativen Erythrozytenvermehrung im Restfiltrat und damit zu einer Hämatokriterhöhung kommt, während umgekehrt bei zu hoher Viskosität die Verformungsgeschwindigkeit der Erythrozyten grösser als die Filtrationsgeschwindigkeit des Suspensionsmediums sein kann und der Erythrozyt hierdurch gebremst wird. Angaben über die Erythrozytenflexibilität, bei denen die Grösse der Plasmaviskosität fehlt oder variiert, sind daher nur eingeschränkt zu verwenden.

Hämatokrit. Unter dem Gesichtspunkt des Hämatokritwertes sollte es das Ziel einer Flexibilitätsmessmethode sein, einen Hämatokritwert zu finden, bei dem die Erythrozyten möglichst als Einzelerthrozyten vorliegen und desaggregiert sind. Die Ergebnisse der exponentiell verlaufenden Kurve in Abhängigkeit ansteigender Hämatokritwerte deuteten darauf hin, dass mit zunehmendem Hämatokrit der Filtrationsdruck (s. Methodik) nicht allein für die Verformbarkeit des Einzelerthrozyten, sondern zusätzlich für die vorher notwendige Desaggregation aggregierter Erythrozyten erforderlich ist.

Druck. Der Druck, mit dem Erythrozytensuspensionen filtriert werden, sollte möglichst im physiologischen Bereich liegen. Darüber hinaus sollten die Druckwerte aus messtechnischen Gründen auch in einem Bereich liegen, in dem weder der Filter noch die Erythrozyten unphysiologisch verformt werden, d.h. gepresst oder gar zerstört. Zusätzliche Messung von Parametern, die eine Hämolyse (α -HBDH, freies Hämoglobin, Hämatokrit) der Suspensionen vor und nach der Filtration anzeigen, zeigten bei den von uns untersuchten und angewendeten Druckwerten beim Hämatokrit zwischen 5 und 15 Vol.-% keinen Hinweis auf eine Erythrozytenzerstörung.

Aus dem Dargelegten muss man insgesamt den Schluss ziehen, dass bei Messmethoden, bei denen z.B. Originalblut mit der Fragestellung nach der Erythrozytenflexibilität vermessen wird, die Grösse der Erythrozytenaggregationstendenz sowie der unterschiedliche Effekt der Plasmaproteine bzw. der Plasmaviskosität die Aussage über die Verformbarkeit des Einzelerthrozyten erheblich einschränken.

Histoautoradiographic demonstration of cytoplasmic DNA synthesis in the cells from human ascitic fluid cultivated in vitro

V. Gotzos and Bona Cappelli-Gotzos

Department of Histology and General Embryology, University of Fribourg, CH-1700 Fribourg (Switzerland), 22 July 1976

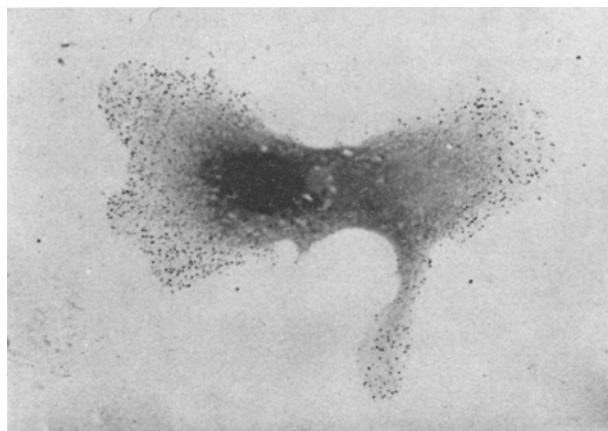
Summary. Cells of human ascitic fluid, cultivated in vitro, showed an activity of cytoplasmic DNA synthesis apparently non-concomitant with a nuclear DNA synthesis.

Cells from ascitic fluid of patients suffering from a cirrhosis of the liver are cultivated in our laboratory. These cells can live in vitro, under our working conditions, 4–5 months¹. The incubation was regularly done with tritiated thymidine (Amersham, spec. act.: 5000 mCi/mmol) after 2 months of culture (0.5 μ Ci/ml of medium: 90% 199 Difco, 10% calf serum, 50 IU/ml penicillin, 50 μ g/ml

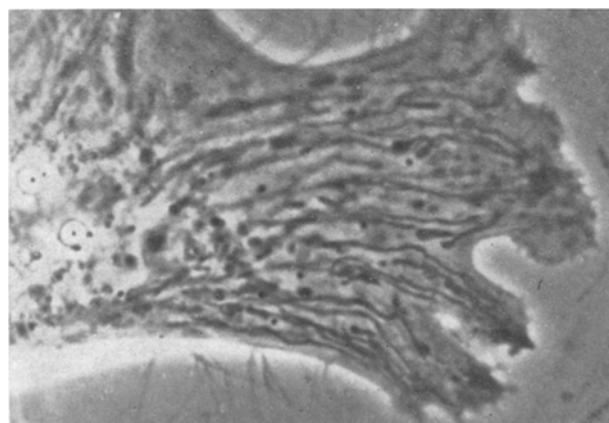
streptomycin). After 30 min incubation at 38°C with the radioactive medium (2 ml each Leighton), the cells were washed 3 times with a serum-free medium at 38°C, the cells remained in the third washing medium 40 min at

1 V. Gotzos, R. Bovet, B. Cappelli-Gotzos and G. Conti, 38^e réunion des Anatomistes Suisses, Fribourg 1975.

a



b



a Cytoplasmic radioactivity after incubation with tritiated thymidine (cytoplasmic DNA synthesis) in a cell from human ascitic fluid, cultivated in vitro. Giemsa, $\times 1200$.

b Cytoplasmic expansion of a living cell from human ascitic fluid, cultivated in vitro. $\times 3500$.

38°C. Afterwards they were washed 3 times with calcium- and magnesium-free phosphate buffered saline (CMF-PBS), then fixed 10 min with ethanol 95%:acetic acid (9:3) and finally air dried.

For histoautoradiography we used the technique described by Gahan²: Kodak Nuclear Track Emulsion, type NTB 2:distilled water, 1:1; developer Kodak D 19; duration of exposure: 10 days at 4°C. 2 controls were used for the activity of DNA synthesis: first neutral deoxyribonuclease (3200 U/mg; 0.05 mg/ml, 24 h digestion) on the fixed cells; second chick embryo fibroblasts cultivated for 3 days and treated with the same histoautoradiographic technique as the cells of the ascitic fluid.

The cells of human ascitic fluid, cultivated in vitro, showed an activity of cytoplasmic DNA synthesis which was at times very important (figure, a). This activity was present in 5–10% of cells, it was not present in the cytoplasm of fibroblasts. They showed an activity of DNA synthesis which was exclusively nuclear. After DNase treatment this activity disappeared. The activity of cytoplasmic DNA synthesis in the cells of human ascitic fluid is apparently not concomitant with a nuclear DNA synthesis; this affirmation is supported by the fact that we did not see any labelled nucleus in the same cells. We note here that the cells showing an activity of cytoplasmic DNA synthesis do not divide by mitosis during the contact with the thymidine-³H.

These cells exhibited large cytoplasmic expansions, characterized by a very rich network of mitochondria (figure, b). Cytoplasmic mitochondrial DNA synthesis and its part in cell metabolism was recently discussed by Ried³, Chèvremont⁴ and Mitchison⁵ and it does not seem to be elucidated.

- 2 P. B. Gahan, in: *Autoradiography for Biologists*, p. 65–87. Academic Press, London and New York 1972.
- 3 B. L. Reid and P. M. Blackwell, in: *Informative Molecules in Biological Systems*, p. 285–301. Ed. L. Ledoux. North-Holland Publishing Company, Amsterdam–London 1971.
- 4 M. Chèvremont, *Arch. Biol. Liège* 83, 269–278 (1972).
- 5 J. M. Mitchison, in: *The Biology of the Cell Cycle*, p. 71. Cambridge University Press 1973.

Isolation and fusion studies on protoplasts from pollen tetrads

P. C. Deka¹, A. K. Mehra, N. N. Pathak and S. K. Sen²

Botany Department, Bose Institute, Calcutta 700 009 (India), 27 April 1976

Summary. Different enzymes were tested for isolation of intact protoplasts from pollen tetrads. About 80% isolation was achieved from pollen tetrads of *Cajanus cajan* and *Zea mays* and about 60% from *Luffa cylindrica* and *Lycopersicon esculentum* after 4 h of treatment with 5% cellulase. When these mononucleate protoplasts were incubated in presence of 0.05 M CaCl_2 in 0.3 M glucose at pH 10.5, 70–80% fusion was achieved. Fusion was rare in sodium nitrate solutions.

Apart from using haploid pollen tetrad protoplasts as a starting material for the production of haploid plants³, they are also suitable for somatic genetics studies, since mutants would easily be detectable in haploids^{4,5}. Fusion experiments with haploid protoplasts could be useful for the study of nuclear behaviour in the fused cell and also for the regeneration phenomenon. Till now most of the studies concerning protoplast isolation, fusion and culture have been restricted to mesophyll and callus protoplasts^{6–11}. The present study deals with the feasibility of isolating intact protoplasts from pollen tetrads from various plant species and their response to different physical and chemical agents to cause fusion.

Materials and methods. Pollen tetrads and pollen grains from *Cajanus cajan*, *Zea mays*, *Luffa cylindrica* and *Lycopersicon esculentum* grown in outdoor conditions have been tested for isolation of intact protoplasts. The actual developmental stages were assessed by examining one of the anther of a flower or floret under microscope, and the rest were sterilized with 5% calcium hypochlorite for 5 min and were then transferred to the enzyme solution (0.2–0.4 ml per anther) containing 0.45 M mannitol at pH 5.4. The anthers were cut with a sharp razor to squeeze out the tetrads or pollen grains with gentle pressing and the remaining debris was removed. Incubation of the released pollen tetrads and pollen grains have