

expériences nous avons observé, par rapport aux témoins, une alcalinisation nette. H. SARLET et M. FLORKIN

Laboratoires de biochimie, Université de Liège, Belgique, le 10 juin, 1949.

#### Summary

The utilization of beeswax by the bacterium isolated by LOZET and FLORKIN from the intestinal content of the waxmoth has been studied. It appears that the bacterium utilizes mostly the acids of the wax, but also a certain amount of esters.

#### Die Wirkung von Kalzium und Serum auf die Wanderung von zitratgeschädigten menschlichen Leukozyten

Tribasisches Natriumzitrat verursacht bei einer Konzentration von 0,2–0,35% in defibriniertem Blut eine fast vollständige Hemmung der Koliphagozytose menschlicher Leukozyten. Diese Hemmung kann durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  nicht vollständig aufgehoben werden. Gibt man zusätzlich zum rekalifizierenden  $\text{CaCl}_2$  noch etwas natives Serum zu, so erlangen die zitratgehemmten Leukozyten wieder volle Phagozytose (ALLGÖWER<sup>1</sup>).

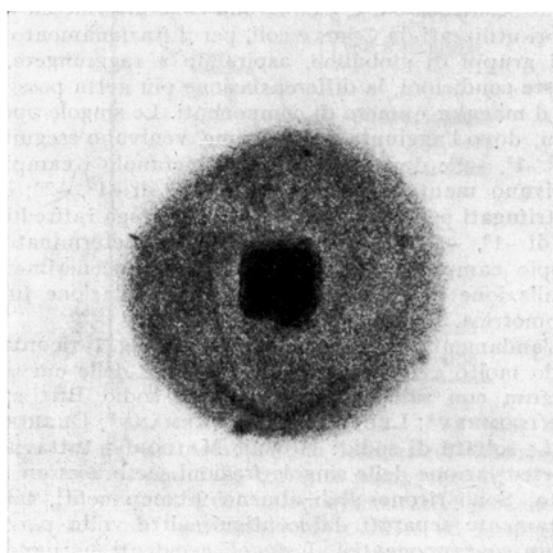


Abb. 1. Leukozytenkultur nach 12 Stunden. Im Zentrum «Leukozytenwürfel», darum herum Auswanderungszone.

Es schien von Interesse, die quantitativen Verhältnisse der Leukozytenwanderung unter Zitratwirkung mit den Befunden bei der Kolibazillenphagozytose zu vergleichen. Dabei mußte uns interessieren:

- Die hemmende Wirkung von Natriumzitrat auf die Wanderung.
- Die restituierende Wirkung von  $\text{CaCl}_2$ .
- Die restituierende Wirkung von  $\text{CaCl}_2 + \text{Serum}$ .

**Technik.** Auf der Methodik von KIAER<sup>2</sup> fußend haben wir einen für menschliche Leukozyten brauchbaren, quantitativen Auswanderungstest ausgearbeitet: Schonend defibriniertes Venenblut wird zentrifugiert, das Serum abpipettiert und die Zellen in Hühnerplasma aufgenommen. Das Gemisch wird sofort wieder zentrifugiert. Dabei tritt Gerinnung ein. Das nichtkontraktile Koagulum des

Hühnerplasmas umfaßt die Leukozytenschicht und erlaubt das Schneiden von gleichmäßigen «Leukozytenwürfeln» von ca. 2 mm Kantenlänge. Diese Leukozytenwürfel werden in Carrel-Flaschen verbracht welche  $0,8 \text{ cm}^3$  Nativ- oder Zitratplasma +  $0,8 \text{ cm}^3$  isotonisch gehaltener Zusätze in Tyrode enthalten. Abwarten der Gerinnung. – In den Brutschrank bei  $38^\circ$  verbracht, zeigen die Leukozytenwürfel nach 8–12 Stunden eine unter gleichmäßigen Versuchsbedingungen gleichmäßige Auswanderung, die bis 10 mm im Durchmesser betragen kann (Abb. 1). Das für diese Versuche verwendete Venenblut stammte von Patienten mit akuten Entzündungszuständen mit ca. 15.000 Leukozyten pro  $\text{cm}^3$  Blut.

Das Zitratplasma wurde gewonnen aus Blut von 0,35% Zitratgehalt. Zur Rekalifizierung wurde pro  $1 \text{ cm}^3$  Zitratplasma  $0,175 \text{ cm}^3$  einer 1,29%igen  $\text{CaCl}_2$ -Lösung verwendet.

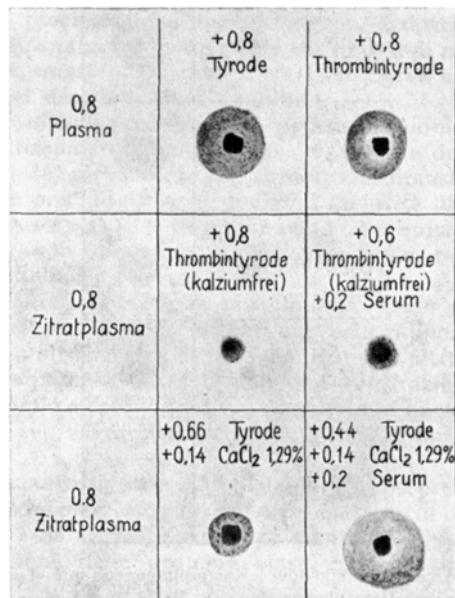


Abb. 2. Wanderungsversuch unter Zitrat-, Kalziumchlorid- und Serum-Einfluß.

Nach Abb. 2 gibt Natriumzitrat, geprüft nach dem beschriebenen Test, eine fast vollständige Hemmung der Leukozytenwanderung. Als Kontrolle diente die Auswanderung in frisch gewonnenem Nativplasma + Tyrode oder Thrombintyrode. Rekalifizieren des Zitratplasmas mit  $\text{CaCl}_2$  vermag die Hemmung nur teilweise zu beheben. Zusatz von  $0,2 \text{ cm}^3$  Serum zu dem rekalifizierten Plasma pro Carrel-Flasche ergibt einen bemerkenswerten Migrationseffekt. Im nichtrekalifizierten Plasma ist die Serumwirkung fast gleich Null.

In 16 Versuchen blieb die restituierende Wirkung des  $\text{CaCl}_2$  auf die Wanderung zitratgehemmter Leukozyten deutlich hinter der Wirkung von  $\text{CaCl}_2 + \text{nativem Plasma oder Serum}$  zurück. In drei Versuchen war dagegen durch Serumzugabe keine wesentliche Steigerung der Wanderung über die Kalziumwirkung hinaus zu erreichen. In drei Fällen erfolgte im eigenen Plasma der Leukozyten sowohl nach Rekalifizieren wie nach Zugabe von Serum keine Wanderung, während dem die gleichen Leukozyten in fremdem Plasma gute Wanderung zeigten. Es handelte sich dabei zweimal um entzündliche Gallenwegsaffektionen mit erhöhten Gallenstoffen im Blut, einmal um eine akute Adnexitis als Herkunftsquelle der Leukozyten, des Plasmas und des Serums.

Es war noch die Frage zu prüfen, ob die stöchiometrische Kalziummenge den besten Wanderungseffekt ergibt. Abb. 3 zeigt die Wirkung steigender Kalziummengen auf die Leukozytenmigration im Zitratplasma. Tatsächlich ergibt  $0,14 \text{ CaCl}_2$  pro  $0,8 \text{ cm}^3$  Zitratplasma

<sup>1</sup> M. ALLGÖWER, Helv. chir. acta 14, 483 (1947); 16, 75 (1949); Schweiz. med. Wschr. 1 und 2 (1947).

<sup>2</sup> S. KIAER, Arch. exp. Ztsch. 1, 289 (1925).

den optimalen Wanderungseffekt. Höhere Mengen wirken rasch hemmend. — Auch in diesem Versuch wurde der Vergleich mit Serumzugabe, zusätzlich zur Rekalzifizierung, gemacht. Zugabe von  $0,2 \text{ cm}^3$  Serum vermag bei 0,07 sowie 0,14  $\text{CaCl}_2$  die Wanderung über die Kalziumwirkung hinaus zu fördern. Interessanterweise ist die Serumwirkung auch dann noch deutlich, wenn das Medium schon eine hemmende Kalziumkonzentration enthält.

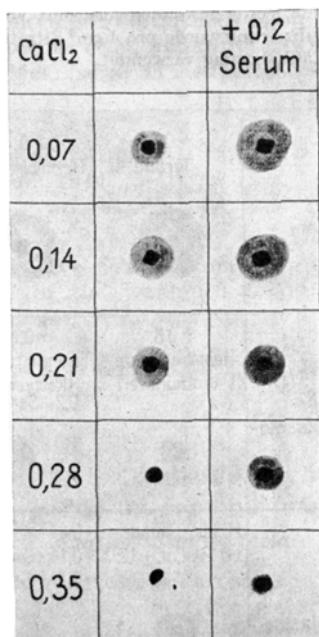


Abb. 3. Wirkung steigender Kalziummengen auf Leukozytenwanderung in Zitratplasma (zweite Reihe unter Serumzugabe).

Die Versuche zeigen, daß die Verhältnisse der Migrationshemmung menschlicher Leukozyten durch tribasisches Natriumzitrat ähnlich liegen wie bei der Phagozytosehemmung gegenüber *E. coli*. Durch Zitrat werden mindestens zwei für die Migration wichtige Elemente «inaktiviert»: 1. Die freien Kalziumionen, 2. Serumfaktoren, deren Natur noch unklar ist. Dies steht in einem gewissen Gegensatz zu den Befunden von DELAUNAY<sup>1</sup>, der in der Zitrathemmung der Leukozytenwanderung einen bloßen Kalziummangeleffekt sieht — allerdings arbeitete er mit sehr aktiven Exsudatleukozyten —. In ihrer Wanderungsfähigkeit durch Zitrat gehemmte Leukozyten erlangen wieder volle Beweglichkeit nach Zufuhr von Kalziumionen und «Serumfaktor».

M. ALLGÖWER

Chirurgische Universitätsklinik Basel, den 12. Juli 1949.

#### Summary

In the inhibition of the migration of human leucocytes by tribasic sodium citrate conditions are similar to those in the inhibition of phagocytosis directed against *E. coli*. At least two elements important for the migration are inactivated by citrate: (1) the free calcium ions, (2) serum factors whose nature is yet unclear. The inhibition of the migration of leucocytes by sodium citrate is reversible. Leucocytes inhibited by citrate acquire full capacity to migrate again after addition of calcium ions and "serum factor".

<sup>1</sup> A. DELAUNAY, Ann. Inst. Pasteur 70, 372 (1944).

#### Curve di solubilità delle proteine plasmatiche in miscele acqua-metanolo a freddo

La dimostrata utilità dell'impiego di solventi organici nel frazionamento di miscele proteiche (COHN e coll.<sup>1</sup>) mi ha suggerito lo studio di curve di solubilità delle proteine plasmatiche in soluzioni di metanolo a concentrazione crescente, a bassa temperatura, in alcune condizioni di  $p_H$  e di forza ionica. Lo scopo prefisso era l'elaborazione di un micrometodo di frazionamento plasmatico che allargasce alla differenziazione delle globuline la tecnica proposta da PILLEMER e HUTCHINSON<sup>2</sup>.

Ogni curva consisteva di 32 frazionamenti, nei quali rimaneva costante la forza ionica, mentre veniva variata la concentrazione (in volume) di metanolo di 2 in 2% tra 0 e 62%. Il plasma utilizzato (plasma ossalatato proveniente da soggetti adulti normali) veniva tamponato con soluzioni di acetato di sodio di  $p_H$  e forza ionica ( $\mu$ ) note; il  $p_H$  risultante dalla miscela plasma + tampone veniva determinato con potenziometro. La forza ionica finale (dopo l'aggiunta di metanolo) venne valutata essere 0,036 in 6 curve, attribuendo al plasma una forza ionica di 0,16 (secondo VAN SLYKE e coll.<sup>3</sup>). Per una curva venne usato un tampone di fosfato di potassio 0,3 molare  $p_H$  6,5: la forza ionica finale in questo caso fu valutata essere 0,092. La gamma di  $p_H$  venne scelta tra 6 e 7, cioè in una zona intermedia tra i valori utilizzati da COHN e coll. per il frazionamento dei vari gruppi di globuline, aspirando a raggiungere, in queste condizioni, la differenziazione più netta possibile per il maggior numero di componenti. Le singole operazioni, dopo l'aggiunta del tampone, venivano eseguite a  $t$  di  $-1^\circ$ ,  $-2^\circ$ : dopo l'aggiunta di metanolo i campioni venivano mantenuti per mezz'ora a  $t$  di  $-1^\circ$ ,  $-2^\circ$ ; indi centrifugati per 15' a 2000 giri in centrifuga raffreddata a  $t$  di  $-1^\circ$ ,  $-2^\circ$ . Sul soprastante veniva determinato in doppio campione l'azoto proteico con incenerimento, distillazione in corrente di vapore e titolazione finale iodometrica.

L'andamento delle curve presentate, fig. 1, ricorda in modo molto evidente l'aspetto generale delle curve di salatura con sali neutri (fosfato di sodio BUTLER e MONTGOMERY<sup>4</sup>; LEUTHARDT e WUHRMANN<sup>5</sup>; DERRIEN<sup>6</sup>; et al.; solfato di sodio: HOWE<sup>7</sup>; MAJOOR<sup>8</sup>); tuttavia la differenziazione delle singole frazioni sembra essere più netta. Sono riconoscibili almeno 9 componenti, talora nettamente separati dai contigui, altre volte parzialmente sovrappontesi. I singoli accidenti si ripetono, nelle varie curve, con simile fisionomia e posizione: tra le variazioni di posizione osservabili, talune possono con una certa probabilità essere attribuite a variazione del  $p_H$ : così il componente precipitante tra 22 e 24% di metanolo a  $p_H$  6,95 pare paragonabile con quello precipitato tra 30 e 34% di metanolo a  $p_H$  6,1–6,2. Altre irregolari e, di regola, meno marcate differenze nella posizione dei singoli tratti nelle varie curve sono più difficilmente interpretabili, mentre non si può escludere che possano rientrare nell'ambito dell'errore sperimentale. L'aumento della forza ionica da 0,036 a 0,092 non ha

<sup>1</sup> E. J. COHN, T. L. McMEEKIN, J. L. ONCLEY, J. M. NEWELL e W. L. HUGHES, iun., J. Amer. Chem. Soc. 62, 3386 (1940).

<sup>2</sup> L. PILLEMER e M. C. HUTCHINSON, J. Biol. Chem. 158, 299 (1945).

<sup>3</sup> D. D. VAN SLYKE, H. B. HASTINGS, C. D. MURRAY e J. SENDROY, iun., J. Biol. Chem. 65, 701 (1925).

<sup>4</sup> A. M. BUTLER e H. MONTGOMERY, J. Biol. Chem. 99, 173 (1933).

<sup>5</sup> F. LEUTHARDT e F. WUHRMANN, Klin. Wschr. 17, 409 (1938).

<sup>6</sup> Y. DERRIEN, Travaux Soc. Chim. Biol. 26, 1, 1091 (1944).

<sup>7</sup> P. E. HOWE, J. Biol. Chem. 49, 93 (1921).

<sup>8</sup> C. H. MAJOOR, J. Biol. Chem. 169, 583 (1947).