

Dinitrochlorobenzol in guinea-pigs, to determine the time and place of the pathogenetic phenomena, as well as the organs and tissues affected. Experiments on skin-explants permitted the separate investigation of the different systems, i.e. the blood, nerve and lymph, presumed to be involved.

It was ascertained that the lymphatic system is absolutely essential for the development of sensitization, and the blood path for its generalized spread.

Aminoacidi della Perilinfia

Ancora oggi le nostre conoscenze sulla origine, sulla funzione e sulla composizione chimica della perilinfia sono limitate ed incerte. Lo studio della costituzione chimica della perilinfia è ostacolato da alcune difficoltà tecniche, relative al prelevamento del materiale ed alla scarsa quantità del liquido perilinfatico ottenibile nella massima parte degli animali.

Poiché non risulta che siano stati condotti studi sugli aminoacidi liberi della perilinfia, abbiamo voluto ricercare queste sostanze a mezzo della cromatografia di ripartizione su carta. Con questa tecnica è stato studiato il liquido perilinfatico del cavallo. La ricerca degli aminoacidi è stata condotta parallelamente sul sangue e sul liquido cerebrospinale degli stessi animali da cui era prelevata la perilinfia, nell'intento di portare un argomento indiretto a favore di una delle due teorie sulla origine della perilinfia, quella che sostiene una derivazione ematica e quella che sostiene una derivazione dal liquido cerebrospinale.

Parte sperimentale. I prelievi della perilinfia furono eseguiti, entro 15-30 min dalla morte, su cavalli dei due sessi e di età tra i sei mesi ed i due anni. La perilinfia era aspirata con pipette capillari attraverso la membrana della finestra rotonda, posta facilmente in evidenza seguendo la via proposta da uno di noi¹. Da ogni orecchio si riusciva a prelevare 0,015-0,025 ml di perilinfia. I vari campioni prelevati, riuniti, erano subito deproteinizzati. Dagli stessi animali da cui si otteneva la perilinfia si prelevava il sangue dai grossi vasi del collo ed il liquido cerebrospinale dal rigonfiamento cervicale.

Per la determinazione qualitativa degli aminoacidi ci siamo serviti della tecnica di analisi cromatografica bidimensionale su carta elaborata da CONSDEN, GORDON e MARTIN² e modificata da DENT³.

La Figura 1 mostra un cromatogramma ottenuto con 1 ml di perilinfia di cavallo. Sono facilmente identificabili i seguenti aminoacidi: 1, acido aspartico; 2, acido glutamico; 3, fosfocolamina; 4, glicina; 5, serina; 6, taurina; 7, treonina; 8, alanina; 9, glutamina; 10, lisina; 11, arginina; 12, acido γ -aminobutirrico; 13, prolina; 14, valina; 15, leucina; 16, tirosina; 17, fenilalanina.

La Figura 2 mostra un cromatogramma ottenuto con 1 ml di perilinfia dopo ossidazione con H_2O_2 e molibdato di NH_4 . È evidente la comparsa di una macchia (n° 18), dovuta all'acido cisteico, che documenta la presenza nella perilinfia di cistina. Si osserva inoltre un'altra macchia (n° 19), meno intensa, che per la posizione farebbe pensare all'acido omocisteico.

Comparando questi cromatogrammi con quelli ottenuti con 1 ml di sangue e, rispettivamente, con 3 ml di

liquido cerebrospinale, si possono valutare le analogie e le differenze che esistono, nei riguardi degli aminoacidi liberi, tra questi tre liquidi biologici.

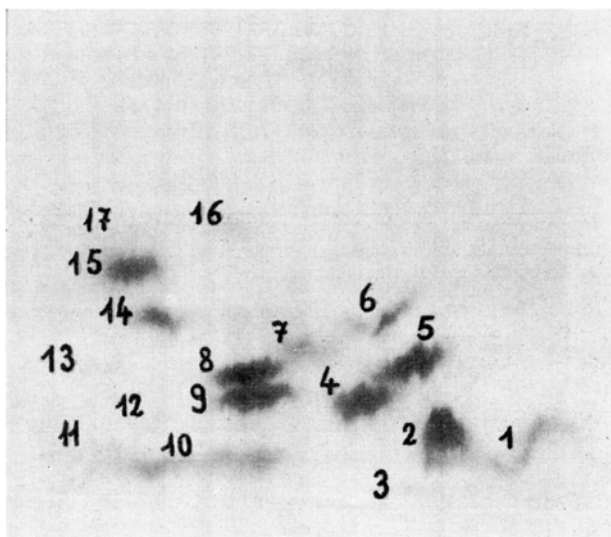


Fig. 1. Cromatogramma bidimensionale ottenuto con 1 ml di perilinfia. Da destra a sinistra: fenolo; dal basso in alto: collidina-lutidina. Le macchie sono numerate come nel testo.

Gli aminoacidi liberi appaiono essere nella perilinfia approssimativamente nella stessa quantità che nel sangue ed in quantità maggiore rispetto al liquido cerebrospinale. Anche per quel che riguarda i rapporti tra i singoli aminoacidi, la perilinfia mostra notevoli somiglianze con il sangue e differenze con il liquido cerebrospinale. Nella perilinfia sono presenti glicina e taurina in notevole quantità, mentre questi due aminoacidi sono scarsamente rappresentati nel liquido cerebrospinale. Inoltre, la prolina e la cistina, chiaramente dimostrabili nel sangue e nella perilinfia, sono quasi del tutto assenti nel liquido cerebrospinale.

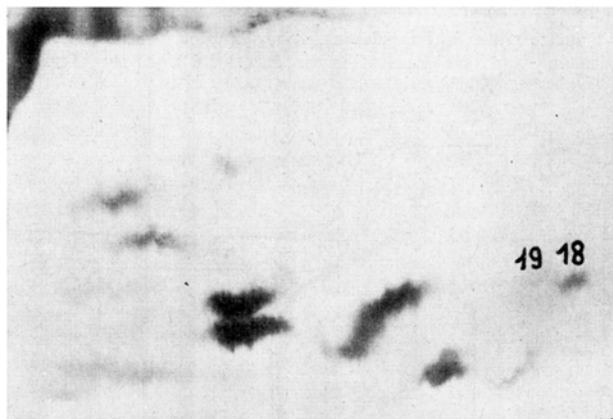


Fig. 2. Cromatogramma bidimensionale ottenuto con 1 ml di perilinfia, ossidata con acqua ossigenata e molibdato di ammonio. Spiegazione nel testo.

Da questa ricerca risulta quindi che gli aminoacidi liberi sono largamente presenti nella perilinfia, e che questo liquido biologico, per il suo contenuto in tali

¹ S. CRIFÒ, in pubblicazione su «Il Valsalva».

² R. CONSDEN, A. H. GORDON e A. J. P. MARTIN, Biochem. J. 38, 224 (1944).

³ C. E. DENT, Biochem. J. 43, 169 (1948).

sostanze, si avvicina al sangue mentre differisce notevolmente dal liquido cerebrospinale.

E. ANTONINI, V. CASORATI e S. CRIFÒ

Istituto di Chimica Biologica ed Istituto di Clinica Otorinolaringologica, Università di Roma, luglio 6, 1955.

Summary

The following aminoacids have been detected in the perilymph from horses by filter paper chromatography: aspartic acid, glutamic acid, phosphocolamine, glycine, serine, taurine, threonine, alanine, glutamine, lysine, arginine, γ -aminobutyric acid, proline, valine, leucine, tyrosine, phenylalanine, cystine.

A comparative study of chromatograms obtained from blood, perilymph and liquor showed that the perilymph is much more similar to the blood than to the cerebrospinal fluid either for qualitative and for quantitative content in aminoacids.

The Formation of Flavin-Adenine Dinucleotide in Liver Cells Prepared from Normal and Alloxan Diabetic Rats

In a previous paper¹ we have shown that less FAD² is found in the liver of alloxan diabetic rats than in normal animals and that FMN or Rib + ATP administration can restore FAD to the normal level.

In the present paper, experiments have been carried out with the object of reproducing *in vitro* the above-mentioned results.

Attempts have previously been made to find the optimum tissue preparation which could convert FMN to FAD.

In experiments with liver homogenates under different conditions of incubation, no formation of FAD has been observed.

Further experiments with preparations of liver cells led us to reproduce *in vitro* the synthesis of FAD from FMN, thus confirming the above-mentioned observation of TRUFANOV³, by which the maintenance of cell structure is essential for this reaction. The cells from the liver of both normal and diabetic rats have been prepared in the following manner⁴: immediately after removal from the animals, the liver was perfused with an isotonic solution of NaCl in order to free it completely from blood. The liver was then cut into small pieces and quickly homogenized in 0.16 M phosphate buffer at pH 6.9 in a Potter-Elvehjem homogenizer, employing a pestle loosely fitting into a cylinder. The suspension so obtained was passed through a nylon filter to remove the stroma elements which are retained by it.

The suspension passed through the filter was centrifuged at 400 $\times$ g for 10 min; the sediment was resuspended in the same buffer and centrifuged at 1500 $\times$ g for 15 min. The same operation was then twice repeated.

The sediment so obtained, when observed under a microscope, contained mainly liver cells, very few blood corpuscles and Kupfer cells.

¹ F. NAVAIO and N. SILIPRANDI, *Exper.* 11, 280 (1955).

² ADP = Adenosindiphosphate; ATP = Adenosintriphosphate; PP = Pyrophosphate; FMN = Flavinmononucleotide or Riboflavin-phosphate; Rib = Riboflavin; FAD = Flavin-adenindinucleotide.

³ A. V. TRUFANOV, *Biokhimiya* 6, 301 (1941); 7, 188 (1942); *Chem. Abstr.* 35, 7499 (1941); 38, 131 (1944).

⁴ We are greatly indebted to Prof. M. BRACCO of the Biochemistry Department of "Villaggio Sanatoriale di Sondalo" for having suggested this procedure.

All the operations described were carried out at 5°C.

The sediment was suspended in phosphate buffer 0.16 M at pH 7.5 and this suspension was used for the incubation. In each experiment the suspension of cells was divided into 5 fractions. One was used for the determination of the dry weight of the cells maintained at 90°C until constant weight was obtained.

The remaining fractions were incubated under identical conditions: one without any addition, the others with the addition of FMN, FMN + ATP, FMN + ATP + insulin respectively.

After incubation the suspension was homogenized in a very close-fitting homogenizer in order to disrupt the cells, and FAD was determined according to the method of BESSEY *et al.*¹.

The incubation and all the manipulations were performed in a dark room.

FAD content of incubated liver cells

Addition	FAD μ g/g dry cells from normal rats	FAD μ g/g dry cells from diabetic rats
No	49.5 $\pm$ 4.7	35.2 $\pm$ 3.1
FMN	60.1 $\pm$ 5.8	34.1 $\pm$ 3.5
FMN + ATP	69.5 $\pm$ 6.1	42.3 $\pm$ 4.0
FMN + ATP + insulin .	70.3 $\pm$ 6.4	44.5 $\pm$ 4.1

The values represent the mean $\pm$ standard error of the mean obtained from 20 normal and 20 diabetic rats.

The incubation mixture contained 30 mg of liver cells (dry weight); 30 μ M MgCl₂ and 56 μ M of phosphate buffer at pH 7.5 in a volume of 4 ml. The substances were added to the mixture in the following amounts: 8 μ M ATP $\cdot$ 4 Na; 0.1 μ M FMN, 4 U.I. insulin powder (Lilly and Co.). Incubation for 3 h at 38°C.

The results shown in the Table indicated that the FAD content of liver cells of alloxan diabetic rats is lower than that of liver cells in normal rats.

The FAD of cells of diabetic rats is not affected by addition to the incubation mixture of FMN. When FMN is added together with ATP, a significant increase is obtained. The addition of FMN together with ATP and insulin is even more effective in increasing the formation of FAD by the cells of diabetic rats. In cells of normal animals, FAD is, on the other hand, increased by the addition of FMN, and the addition of FMN + ATP is even more effective to increase the yield of FAD. Insulin does not increase the effect of FMN + ATP on the normal cells.

These results are in agreement with those previously obtained *in vivo*, except for the effect of FMN on FAD formation by diabetic liver. While *in vivo* FMN enhances the formation of FAD, *in vitro* it fails to produce this effect unless ATP is added at the same time. In any case, both content and formation of FAD in alloxan diabetic rats is lower than in normal animals.

The maintenance of cell structure seems to be essential in promoting *in vitro* the formation of FAD from FMN.

N. SILIPRANDI, F. NAVAIO, and P. FIORETTI

Institute of Biological Chemistry, University of Rome, Italy, May 23, 1955.

¹ O. A. BESSEY, O. H. LOWRY, and R. H. LOVE, *J. biol. Chem.* 130, 755 (1949).