

### Amino Acid Studies in Relation to Yolk Utilization in the Chick Embryo

EMANUELSSON<sup>1</sup> has demonstrated three separate proteolytic enzymes in the yolk of the chick egg by incubation procedures *in vitro* and WILLIAMS *et al.*<sup>2</sup>, using paper chromatography, have reported an increase of free amino acids of whole yolk from the fourth to the 10th day of incubation. It seemed important to supplement the existing knowledge concerning the amino acid pools of the hen's egg by assaying the level of free amino acids in the solid yolk, fluid yolk and blood between 3 and 12 days of incubation.

**Materials and Methods.** Samples of blood were collected at 7, 9, and 12 days by isolating a section of a vitelline artery over a small plastic 'boat', and after carefully cleaning the vessel of investing tissue, the artery could be cut and the 'clean' blood collected from the plastic boat. From 3 until 10 days of incubation in the chicken egg there is a volume of liquid (sub-blastodermic fluid or fluid yolk), containing soluble protein, which lies beneath the embryo and above the solid yolk (ROMANOFF<sup>3</sup>). This fluid was collected by means of small bore mouth pipets and it was then centrifuged at 18,000 g for 10 min to free it of yolk granules. Trichloroacetic acid was added to the solid yolk, liquid yolk and blood to give a final concentration of 10%.

Since the object of this investigation was to determine total free amino acid content in these various fractions the use of Folin's amino acid reagent for the colorimetric

estimation of amino nitrogen (KOCH and HANKE<sup>4</sup>) seemed quite adequate. Total nitrogen determinations were made utilizing the nesslerization procedure described in UMBREIT *et al.*<sup>5</sup>.

**Experimental Results.** To give an idea of the rate of growth, embryo dry weights were obtained and these are given in the Table; embryos were pooled in obtaining the dry weights of the early stages. Also in the Table the total nitrogen values of TCA precipitates from 5 cm<sup>3</sup> samples of fluid yolk during this same period are indicated. At 3 days of incubation approximately 5 cm<sup>3</sup> of liquid yolk could be obtained from the yolk sac, at 4 days there was about 10 cm<sup>3</sup> and approximately 15 cm<sup>3</sup> at 6 and 8 days; the volume decreases after this time.

In the series of analyses for amino nitrogen in fluid yolk samples the data show an amino acid increase during development (Table), and it is probable that this increase results from proteolysis of yolk protein, although these amino acids could have another source (albumin, embryo or its membranes). Based on equal sample volumes, the free amino acids maintained a constant concentration in the blood and the solid yolk during the period from 3 to 12 days of incubation (Table).

**Acknowledgment.** This work was aided by a grant from the Committee on Growth Acting for the American Cancer Society and a University of California Cancer grant.

R. A. FLICKINGER

*Department of Zoology, University of California, Los Angeles, October 29, 1956.*

<sup>1</sup> H. EMANUELSSON, *Acta physiol. Scand.* **34**, 124 (1955).

<sup>2</sup> M. A. WILLIAMS, W. A. DA COSTA, L. H. NEWMAN, and L. H. MARSHALL, *Nature* **173**, 490 (1954).

<sup>3</sup> A. ROMANOFF, *The avian egg*. (John Wiley and Sons, Inc., 1949).

<sup>4</sup> F. C. KOCH and E. HANKE, *Practical methods in biochemistry* (The Williams and Wilkins Co., 1948).

<sup>5</sup> W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS, and J. F. STAUFFER, *Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism* (Burgess Publishing Company, 1948).

Days of development	Embryo dry weight mg	Fluid yolk acid insoluble nitrogen in 5 cm <sup>3</sup> samples μg	Fluid yolk amino nitrogen in 5 cm <sup>3</sup> samples μg	Whole blood amino nitrogen in 1 cm <sup>3</sup> samples μg	Solid yolk amino nitrogen in 5 cm <sup>3</sup> samples μg	
3		2,700	1,025		1,024	
		2,800	1,073		1,251	
		2,706	1,066		1,274	
		4,120	1,036		1,274	
4	5.5	3,600	1,137			
		3,034	1,260			
		4,000	1,160			
		3,600				
		3,437				
6	28	8,800	1,285		865	
		6,000	1,320			1,019
		7,400				1,061
7				125	1,134	
				135		
8	86	13,000	1,373			
		10,860	1,400			
		12,657	1,420			
9				135	1,349	
				122	1,221	
10	145	21,200	1,486		1,040	
		16,300	1,460		1,279	
		21,430	1,500			
12				146	1,307	
				109	653	
					920	

Résumé

On démontre que les acides aminés libres du vitellus liquéfié augmentent pendant le développement de l'embryon, ce qui suggère une hydrolyse de ses protéines.

**Wirkung von Polysacchariden bakterieller Herkunft auf die experimentelle Lipämie**

In früheren Arbeiten unseres Laboratoriums wurden verschiedene pharmakologische Wirkungsqualitäten von Polysacchariden bestimmter Art beschrieben, wie die spezifische Wirkung auf die Chemotaxis der Leukozyten<sup>1</sup>, auf die entzündlichen Reaktionen des Bindegewebes<sup>2</sup>, sowie auf verschiedene Infektions-<sup>3</sup> und anaphylaktische<sup>4</sup> Phänomene.

Zu den bekannten Wirkungsqualitäten bestimmter Polysaccharide, wie zum Beispiel Heparin und Manuronat, gehört auch deren Antilipämie- und blutgerinnungshemmende Wirkung. Es schien deshalb wichtig, Polysaccharide verschiedener Art und Herkunft auch auf ihre antilipämische Wirkung *in vivo* und auf ihre Wirksamkeit auf die Plasmagerinnung *in vitro* zu untersuchen.

Die Antilipämie-Wirkung *in vivo* wurde, wie üblich, an Hand der Klärung des Serums lipämischer Ratten bestimmt, im wesentlichen nach der von CONSTANTINIDES *et al.* angegebenen Methode<sup>5</sup>. Eine Gruppe von mindestens 5 bis 10 Ratten erhält nach 16stündigem Hungern je Ratte 3 ml Maisöl pro 100 g *per os* (enthaltend 0,3 g Zellulose, um Intoleranzerscheinungen zu vermeiden) und bleibt unbehandelt. Sie dient als Kontrollgruppe. Die 5-10 Ratten jeder anderen Gruppe erhalten unmittelbar nach Maisölverabreichung je die gleiche Dosis des zu prüfenden Präparates intravenös in die Schwanzvene. 2 h nach der Injektion werden die Tiere in Avertinarkose (1 ml/100 g intraperitoneal einer 2prozentigen Lösung) aus der Carotis in ein Zentrifugenglas entblutet, das Blut 30 min bei 3000 U./min zentrifugiert, das Serum abgehoben, 1:5 mit Wasser verdünnt und der Trübungswert einzeln bestimmt. Als Kontrolle dient das gesammelte 1:5 verdünnte Serum der Kontrollratten (1 ml Serum jedes Tieres). Die Trübung wird je Tier nephelometrisch in einem Coleman-Spektrophotometer (Mod. 14) bei 610 m $\mu$  in Prozent Transmission abgelesen, nachdem das verdünnte Mischserum der Kontrollratten auf 100% Transmission gestellt worden ist. Das arithmetische Mittel der Trübungswerte der Ratten je Präparatdosis (im Vergleich zum Kontrolltrübungswert = 100%) gibt die *prozentuale Klärung* durch die injizierte Präparatdosis. Die Präparatdosen werden so gewählt, dass eine 50prozentige Klärung durch mehrere Dosen (pro Gruppe) sowohl unter- wie überschritten wird, so dass durch Interpolation die Dosis eruiert werden kann, welche 50prozentige Klärung verursacht (= ED<sub>50</sub>). Die *blutgerinnungshemmende Wirkung* wurde im Rekalzifizierungsversuch an Rinderoxalatplasma *in vitro* bei 37°C untersucht.

*Befunde.* Die in der Tabelle zusammengestellten Präparate umfassen nur einen Teil der von uns geprüften, und zwar nur die antilipämisch wirksamsten Präparate. Die Einteilung erfolgte nach deren Herkunft, Fraktionierung und Antilipämiewirkung. Die Wirksamkeit ist ausgedrückt in Effektivdosen.

<sup>1</sup> R. MEIER, Z. exp. Med. 87, 283 (1933). - R. MEIER und B. SCHÄR, Exper. 9, 93 (1953); 10, 376 (1954); Z. physiol. Chem. (im Druck).

<sup>2</sup> R. MEIER, P. A. DESAULLES und B. SCHÄR, Arch. exp. Path. Pharm. 224, 104 (1955).

<sup>3</sup> R. MEIER und L. NEIPP, Schw. med. Wschr. 86, 249 (1956).

<sup>4</sup> R. MEIER, H. J. BEIN und R. JAQUES, Exper. 12, 235 (1956).

<sup>5</sup> P. CONSTANTINIDES, A. CAIRNS und A. WERNER, Canad. Res. Conc. Abstr. West. Reg. Meet. 19, 1954.

Polysaccharide bakterieller Herkunft

Charakterisierung der Präparate	Antilipämie ED <sub>50</sub> % Klärung $\gamma$ /kg intraven.	Rekalzifizierung (Gerinnung <i>in vitro</i> )	
		E. K. %	Wirkung
1. Aus gramnegativen Bakterien (78 Präparate untersucht)			
A = Äthanol-fällung aus Kulturfiltrat . . . . .	1000		
Subfraktionierung von A:			
Aa . . . . .	4	0,05	Ø
Ab . . . . .	20		
Ac . . . . .	35		
Ad . . . . .	35		
Ae . . . . .	60		
Af . . . . .	70		
Ag . . . . .	100		
Ah . . . . .	1000		
Ai . . . . .	1000		
Subfraktionierung von Aa:			
Aa/1 . . . . .	8	0,05	Ø
Aa/2 . . . . .	10		
Aa/3 . . . . .	1000		
B = Mit 3 Volumen Äthanol aus Kulturfiltrat nicht fällbar . . . . .	10000		
Subfraktionierung von B:			
Ba . . . . .	250		
Bb . . . . .	500		
Bc . . . . .	1000		
C = Fraktionierung des Kulturfiltrats unter Vermeidung organischer Lösungsmittel . . . . .	400	0,1	Ø
D = Fraktion aus Bakterienrückstand . . . . .	75		
Subfraktionierung von D:			
Da . . . . .	1	0,05	Ø
Db . . . . .	4		
E = Kombination der Fraktionierung nach D, Da, Db aus Bakterienrückstand . . . . .	1	0,05	Ø
F = Nebenfraktion von E . . . . .	5	0,05	Ø
G = Nebenfraktion von F . . . . .	1000	0,05	Ø
2. Aus grampositiven Bakterien (2 Präparate untersucht) . . . . .	0	0	
3. Aus Mykobakterien (6 Präparate untersucht) . . . . .	0	0	

Die Polysaccharide aus gramnegativen Bakterien wurden aus dem Kulturmedium oder auch aus Bakterienrückständen von Proteus gewonnen und auf verschiedene Weise fraktioniert<sup>6</sup>. Die Beziehung der einzelnen Präparate zueinander hinsichtlich ihrer Fraktionierung ist aus der Tabelle ersichtlich. Die in der Tabelle angegebenen wirksamsten aller als wirksam zu bezeichnenden Präparate dürften in der Hauptsache den Lipopolysaccharidfraktionen zuzurechnen sein.

Unter diesen Präparaten finden sich Fraktionen, welche in Effektivdosen ab 1  $\gamma$ /kg intravenös die experimentelle Lipämie an Ratten um 50% vermindern. Es gelingt somit die bei der Lipämieklärung *in vivo* wirksame Substanz anzureichern. Angegeben sind nur solche Präparate, deren Effektivdosis 1 mg/kg intravenös

<sup>6</sup> Die Präparate bzw. Fraktionen wurden in unseren chemischen Laboratorien von Dr. F. W. KAHNT dargestellt.