

genat das GLUBR in seine Spaltprodukte, u.a. Rhodanid und Sulphat Ionen⁴. Die im Extrakt enthaltenen Verbindungen wurden mittels Papierchromatographie entweder direkt, oder nach Reinigung durch Dünnschichtchromatographie auf Silikagel G⁸ analysiert. Die Radioaktivität der Flecke wurde im fensterlosen Methandurchflusszählrohr bestimmt.

Als Lösungsmittel für den Nachweis des GLUBR in den Extrakten dienten: *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:3) und Pyridin-Amylalkohol-Wasser (7:7:6). Ausser der Aktivität im GLUBR-Fleck war eine bedeutende Aktivität in der Zone um den Start zu verzeichnen. Hier laufen neben anderen Verbindungen die schwefelhaltigen Aminosäuren. Das mittels Chromatographie auf Dünnschicht gereinigte GLUBR war nach der Extraktion mit Pyridin teilweise zersetzt und enthielt ausser dem eigentlichen GLUBR eine weitere S³⁵-haltige Verbindung, die einen dem Ascorbinsäure ähnlichen aber niedrigeren Rf-Wert hat. Wir konnten uns überzeugen, dass diese Verbindung durch Zersetzung von GLUBR entsteht und zwar einerseits durch Wärme, vor allem jedoch durch eine katalytische Wirkung des Silikagels. Dagegen enthielten wässrige Pflanzenextrakte, in denen GLUBR durch Myrosinase zersetzt war, ausser Aktivität am Start (Sulphationen) auch noch markierte Rhodanidionen, die in Aufarbeitungen mit inaktivierter Myrosinase nicht nachgewiesen werden konnten.

Unsere Ergebnisse über den Einbau von SO₂, welches zum erstenmal als Schwefelspender für Glukosinolat-synthese verwendet wurde, stehen in Übereinstimmung mit WETTERS⁹, sowie auch mit SCHRAUDOLFS⁶ Versuchen.

Unsere Arbeit zeigt die Bedeutung von SO₂ im Zusammenhang mit dem Gehalt an strumigenen Stoffen in den Pflanzen der Gattung *Brassica* hin. GLUBR selbst, für

welches man annehmen kann, dass es bei bestimmten Pflanzen einen gewissen Schwefelspeicher darstellt, ist eine Vorstufe der strumigen wirkenden Rhodanidionen. Die goitrogene Wirkung der Rhodanidionen ist zwar schwächer, doch ist die Konzentration ihrer Vorstufe relativ hoch. Da SEDLÁK¹⁰ durch die Zufuhr einer erhöhten Sulfatmenge in den Boden einen hoch strumigen Blätterkohl erhalten hat, muss nach den hier mitgeteilten Ergebnissen in Industriegebieten mit erhöhtem SO₂-Gehalt in der Atmosphäre auch dieser Faktor zu einer Erhöhung der strumigen Eigenschaften dort angepflanzter Cruciferen führen.

Summary. In plants of the *Brassica oleracea* species contaminated with S³⁵O₂, incorporation of radioactive sulphur into glucosinolate glucobrassicin has been found. The label is present also in the isothiocyanate group of glucobrassicin, which by decomposition under the action of myrosinase liberates labelled thiocyanate.

M. KUTÁČEK, J. SPÁLENÝ
und K. OPLŠTILOVÁ

Institut für experimentelle Botanik, Abteilung für Radiobiologie der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha, und Institut für Landschaftsgestaltung und Landschaftsschutz der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha (Czechoslovakia), 28. Juli 1965.

⁸ M. KUTÁČEK and Ž. PROCHÁZKA, *Régulateurs naturels de la croissance végétale* (Gif-sur Yvette 1963), p. 445.

⁹ L. R. WETTER, *Phytochemistry* 3, 57 (1964).

¹⁰ J. SEDLÁK, *Nature* 192, 377 (1961).

The Reticulo-Endothelial Localization of Hepatic Acetylcholinesterase

The localization of hepatic non-neuronal cholinesterases and their biological functions is obscure. Hepatic non-neuronal acetylcholinesterase has been said to be located in histiocytes¹ or on connective tissue fibres². As part of a study on the enzyme histochemistry of liver metabolism acetylcholinesterase distribution was investigated in adult male Flemish giant rabbits.

After 16 h fixation in cold 4% formaldehyde-saline, liver tissue was sectioned at 16 μ on a cryostat at -25°C . Enzyme localization was performed by a modification³ of the COUPLAND and HOLMES technique⁴, using acetylthiocholine iodide substrate for acetylcholinesterase (AcChE) and *n*-butyrylthiocholine iodide for butyrylcholinesterase (BuChE)⁵. The buffer system used was 0.1 *M* 2-amino-2-(hydroxy-methyl)-propane-1:3-diol/0.1 *N* HCl. Enzyme specificity was checked by co-incubation with $1 \cdot 10^{-5}$ *M* physostigmine⁶, $1 \cdot 10^{-5}$ *M* 62C47h diiodide⁷, and $2 \cdot 10^{-5}$ *M* Mipafox⁸. The optimum substrate pH value and incubation time for AcChE were 5.5 and 4 h, and for BuChE 5.4 and 6 h. In one group of animals the vascular pattern was outlined by perfusion with Berlin Blue in a 2% aqueous solution⁹. In a further group the Kupffer cells were visualized by injecting Indian ink intravenously 30 min before killing the animals.

AcChE is located in cells lining the sinusoids of (classical hexagonal) lobules (Figure). The reaction is centri-

and mid-lobular in location. The centrilobular vein wall gives a negative reaction for AcChE. The sinusoidal lining location of the AcChE positive cells is further confirmed in the Berlin Blue perfused group of experimental animals. Also, in animals receiving intravital Indian ink, AcChE activity is found closely related to the colloidal particles in phagocytic cells, further suggesting the Kupffer cell localization of AcChE. BuChE is present within hepatocytes and related to intrahepatic nerves.

Although the true biological functions of non-neuronal cholinesterases (—) are obscure, there is some suggestion as to their role at certain sites. These include ionic trans-

¹ M. A. GEREBTZOFF, *Cholinesterases* (Pergamon Press, London 1959), p. 8.

² S. D. SUTHERLAND, *J. Anat., Lond.* 98, 321 (1964).

³ B. BALLANTYNE and R. G. BURWELL, *Nature* 206, 1123 (1965).

⁴ R. E. COUPLAND and R. L. HOLMES, *Quart. J. micr. Sci.* 98, 327 (1957).

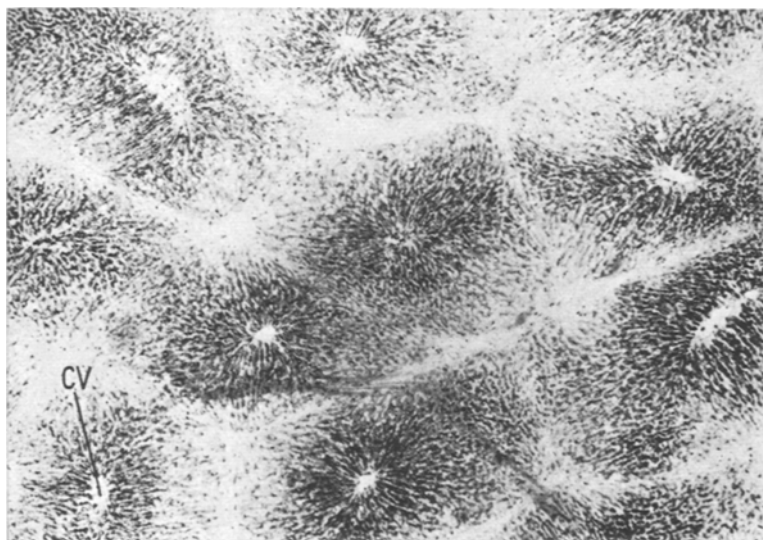
⁵ G. B. KOELLE, *J. Pharmacol. exp. Therap.* 100, 158 (1950).

⁶ M. S. BURSTONE, *Enzyme Histochemistry* (Academic Press, New York and London 1962), p. 293.

⁷ P. C. DIEGENBACH, *Nature* 207, 308 (1965).

⁸ C. W. M. ADAMS, E. A. MARPLES, and J. R. TROUNCE, *Clin. Sci.* 19, 473 (1960).

⁹ J. TRUETA, A. E. BARCLAY, P. M. DANIEL, K. J. FRANKLIN, and M. L. L. PRITCHARD, *Studies of the Renal Circulation* (Blackwell Scientific Publications, Oxford 1947), p. 43.



Normal rabbit liver showing the distribution of acetylcholinesterase. Note: (i) the positive reaction in the sinusoidal lining cells located in the centri- and mid-lobular position; (ii) the absence of acetylcholinesterase from the periphery of the lobule; (iii) the absence of acetylcholinesterase from the wall of the centrilobular vein (CV); (iv) the absence of any portal tract activity. (pH = 5.5; incubation time = 4 h; section thickness = 16 μ ; magnification = $\times 31$.)

port^{10,11}, detoxification^{3,12-14}, regulation of tissue size³, and assimilation of food¹. In liver the hepatocyte associated BuChE has been specifically implicated in the hydrolysis of the potentially toxic ester butyrylcholine at its site of formation¹³, or in the process of food assimilation in general¹. It is generally accepted that plasma pseudocholinesterase is of hepatic origin^{1,15,16}.

In the rabbit hepatic AcChE is solely located in certain sinusoidal reticulo-endothelial cells, to which many functions have been ascribed. These include (i) phagocytosis of colloidal particles¹⁷, bacteria¹⁸, viruses¹⁹⁻²¹, and effete, damaged, or foreign erythrocytes^{17,22,23}, (ii) deposition of exogenously derived cholesterol²⁴⁻²⁶, (iii) prothrombin synthesis²⁷, (iv) uptake and metabolism of bilirubin²⁸⁻³⁰, and (v) lipid metabolism³¹.

It might be considered that Kupffer cell AcChE would be suitably placed to hydrolyse any acetylcholine released into the portal circulation. However, the possible role of hepatic AcChE in lipid and general ester metabolism has attracted our attention. Previous work^{3,12,14} led to the suggestion that cholinesterases situated in macrophages and endothelial cells in lymphoid tissue may be concerned in the inactivation of any potentially toxic esters produced as a result of lipid metabolism during mitosis. That cholinesterases act on a wide spectrum of choline and non-choline ester substrates is now verified³²⁻³⁵. That AcChE in hepatic reticulo-endothelial cells could play a role in lipid and ester metabolism generally, or in detoxification following phagocytosis, is in keeping with the observed variations in hepatic reticulo-endothelial function induced by simple lipids³⁶, and more specifically the stimulating effect of choline^{31,37}.

Zusammenfassung. Die Acetylcholinesterase wurde histochemisch in den sinusoidal-reticulo-endothelialen Zellen der Kaninchenleber gefunden. Es wird angenommen, dass das Enzym an der Fett- und Esterumwandlung beteiligt ist.

B. BALLANTYNE

Department of Anatomy, School of Medicine, University of Leeds (England), July 28, 1965.

- ¹⁰ B. BALLANTYNE, Univ. Leeds med. J. 8, 50 (1959).
- ¹¹ H. J. KOCH, in *Recent Developments in Cell Physiology* (Ed.: J. A. KITCHING; Butterworth Scientific Publications, London 1954), p. 15.
- ¹² B. BALLANTYNE, J. Anat., Lond. 98, 689 (1965).
- ¹³ J. W. CLITHEROW, M. MITCHARD, and N. J. HARPER, Nature 199, 1000 (1963).
- ¹⁴ B. BALLANTYNE, J. Roy. micr. Soc. 84, 404 (1965).
- ¹⁵ O. SVENSMARK, Acta physiol. Scand. 59, Suppl. 213 (1963).
- ¹⁶ C. H. SAWYER and J. W. EVERETT, Am. J. Physiol. 148, 675 (1947).
- ¹⁷ B. BENACERRAF, in *The Liver* (Ed.: Ch. ROUILLER; Academic Press, New York and London 1964), vol. 2, p. 37.
- ¹⁸ B. BENACERRAF and P. MIESCHER, Ann. N.Y. Acad. Sci. 88, 184 (1960).
- ¹⁹ R. KELLER and M. L. ZATZMAN, J. Immunol. 83, 167 (1959).
- ²⁰ K. T. BRUNNER, D. HUREZ, R. T. MCCLUSKEY, and B. BENACERRAF, J. Immunol. 85, 99 (1960).
- ²¹ C. A. MIMS, Brit. J. exp. Path. 40, 533 (1959).
- ²² P. MIESCHER, Rev. Hematol. 11, 248 (1956).
- ²³ B. N. HALPERN, G. BIOZZI, B. BENACERRAF, and C. STIFFEL, Am. J. Physiol. 189, 520 (1957).
- ²⁴ M. FRIEDMAN, S. O. BYERS, and R. H. ROSENMAN, Am. J. Physiol. 177, 77 (1954).
- ²⁵ L. FEIGENBAUM, S. O. BYERS, and M. FRIEDMAN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 85, 530 (1954).
- ²⁶ M. FRIEDMAN, S. O. BYERS, and J. ST. GEORGE, Am. J. Physiol. 184, 141 (1956).
- ²⁷ C. A. BOUVIER and P. A. MAURICE, in *The Liver* (Ed. Ch. ROUILLER; Academic Press, New York and London 1964), vol. 2, p. 177.
- ²⁸ I. M. ARIAS, in *Progress in Liver Diseases* (Ed. H. POPPER and F. SCHAFFNER; Grune and Stratton, New York and London 1961), vol. 1, p. 191.
- ²⁹ M. A. SPELLBERG, *Diseases of the Liver* (J. & A. Churchill Ltd., London 1955), p. 5.
- ³⁰ A. E. DUMONT, S. H. STERZER, and G. H. MULHOLAND, Am. J. Physiol. 202, 707 (1962).
- ³¹ J. H. HELLER, Science 118, 353 (1953).
- ³² D. F. HEATH, *Organophosphorus Poisons* (Pergamon Press, Oxford 1961), p. 103.
- ³³ L. D. MOUNTER and R. M. CHEATHAM, Enzymology 25, 215 (1963).
- ³⁴ R. D. CHESICK, J. Histochem. Cytochem. 2, 258 (1954).
- ³⁵ D. NACHMANSOHN and I. B. WILSON, in *Advances in Enzymology* (Interscience Publishers, New York 1951), vol. 12, p. 259.
- ³⁶ A. E. STUART, G. BIOZZI, C. STIFFEL, B. N. HALPERN, and D. MOUTON, Brit. J. exp. Path. 41, 599 (1960).
- ³⁷ Acknowledgments: I wish to thank Mr. R. K. ADKIN and Mr. R. H. NETTLETON for their skilled technical assistance in the preparation of this work. I also wish to thank the Wellcome Research Laboratories for the gift of the anticholinesterase 62C47h diiodide.