

pyridoxine for this compound. Five years later, SNELL⁴ and his associates⁵ showed that vitamin B₆ exists not only as the trihydroxy compound just mentioned, but also as 3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methyl-4-pyridinecarboxaldehyde and 3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methyl-4-pyridinemethylamine. Further studies^{6,7} indicated that vitamin B₆ likewise exists as the 5-phosphates of these latter 2 compounds.

Since at least 5 compounds of more or less different principal chemical functions exhibit vitamin B₆ activity, it is evident that the vitamin cannot be adequately indicated by a single ordinary chemical name. One approach to the problem was offered by LARDY⁸ when he adopted the term pyridoximers for the 3 unesterified forms of vitamin B₆. This term, however, although of special value in suggesting the chemical interrelationships among these 3 forms, does not satisfy all present needs: pyridoximers can be applied only to individual forms of vitamin B₆; what is still lacking is a one-word term that can be employed, without discrimination, for any and all forms of the vitamin.

Rule V-7 of the 'Definitive Rules for the Nomenclature of the Vitamins' of the International Union of Pure and Applied Chemistry⁹ provides the name pyridoxol for the trihydroxy compound, the names pyridoxal and pyridoxamine being used for the aldehyde and the amine, respectively. The same rule also provides that pyridoxine may be used as a group name representing all of these compounds, including 5-phosphates. Regrettably, this second provision tends to aggravate existing ambiguity, since pyridoxine has often been used as a group name, but it also continues in extensive use as a synonym for pyridoxol alone. A proposed revision of this rule¹⁰ would allow pyridoxol and pyridoxine to be used interchangeably, but no generally acceptable one-word equivalent for vitamin B₆ has yet been introduced.

The previously non-independent term pyridox might perhaps be appropriate as a single word representing every naturally occurring pyridine derivative with vitamin B₆ activity. Although this term has never before been used by itself, it has obviously been used countless times as a linguistic structure shared by all words containing it. Unlike most chemical names, the name pyridox has no ending that indicates any specific principal chemical function; but that fact is in this instance an advantage instead of a disadvantage, since the purpose of the name is to suggest vitamin B₆ function in general rather than any chemical function in particular.

Regardless of whether our term pyridox is eventually adopted, we strongly urge that the ambiguous term

pyridoxine be used only where there is no significant danger of confusion. Where absolute clarity is essential, pyridoxol can be used for the trihydroxy compound and pyridox can be used as a one-word synonym for vitamin B₆ as long as no better suggestion is made.

Our proposals may not be the best possible solution to the nomenclature problem outlined here. Nevertheless, these proposals are so simple and straightforward that they ought to be useful at least as an initial step towards a final solution to the problem. Thus we offer our proposals not only for consideration as a possible solution to a nomenclature problem that we have sometimes found fairly vexing, but also as a stimulus for further thinking on the subject¹¹.

Zusammenfassung. Der Name Vitamin B₆ hat Nachteile. Ein Ausdruck, der das Wort Vitamin enthält, ist nicht in allen Fällen zutreffend, und ein zweiwörtiger Ausdruck passt schlecht in gewissen Zusammenhängen. Da wenigstens 5 verwandte, aber verschiedene Verbindungen Vitamin-B₆-Aktivität besitzen, ist ein einziger, gewöhnlicher chemischer Name unzulänglich. Frühere Vorschläge weisen mehrere Mängel auf. Wir schlagen Pyridox vor.

W. R. RENNAGEL and W. KORYTNYK

Department of Medical and Scientific Communications and Department of Experimental Therapeutics, Roswell Park Memorial Institute, Buffalo (New York 14203, USA), 31 August 1967.

¹ S. A. HARRIS and K. FOLKERS, J. Am. chem. Soc. **61**, 1245 (1939).

² R. KUHN, K. WESTPHAL, G. WENDT and O. WESTPHAL, Naturwissenschaften **27**, 469 (1939).

³ P. GYÖRGY and R. E. ECKHARDT, Nature **144**, 512 (1939).

⁴ E. E. SNELL, J. biol. Chem. **154**, 313 (1944).

⁵ S. A. HARRIS, D. HEYL and K. FOLKERS, J. biol. Chem. **154**, 315 (1944).

⁶ J. C. RABINOWITZ and E. E. SNELL, Analyt. Chem. **19**, 277 (1947).

⁷ J. C. RABINOWITZ and E. E. SNELL, J. biol. Chem. **169**, 643 (1947).

⁸ H. A. LARDY, J. chem. Educ. **25**, 262 (1948).

⁹ Commission on the Nomenclature of Biological Chemistry (International Union of Pure and Applied Chemistry), J. Am. chem. Soc. **82**, 5581 (1960).

¹⁰ IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, J. biol. Chem. **241**, 2987 (1966).

¹¹ The advice and assistance that we have received from E. E. SNELL and H. A. LARDY are greatly appreciated.

PRO EXPERIMENTIS

Zur Frage der Markierung einzelner Nervenzellen durch Mikroelektroden

Bei Ableitungen von bioelektrischen Potentialen von Nervenzellen wird häufig die Mikroelektrodenteknik angewendet. Die Markierung und Identifizierung dieser Zellen in histologischen Präparaten ist immer problematisch, ein Umstand, der besonders beim Studium eines so heterogenen Gewebes wie des Nervengewebes ins Gewicht fällt.

Eine Markierung von Nervenzellen lässt sich auf verschiedene Weise durchführen. So kann etwa der Ort der Mikroelektroden spitze durch eine Läsion gekennzeichnet

werden, und zwar durch einen Hochfrequenzstrom bei metallischen Mikroelektroden¹ oder, bei Glasmikroelektroden, elektrolytisch durch Gleichstrom². Die dadurch

¹ K. FRANK und M. C. BECKER, in *Physical Techniques in Biological Research* (Ed. W. L. NASTUK; Academic Press, New York 1964), p. 59.

² J. ŠTERC, V. NOVÁKOVÁ und J. BAUER, Čs. Fysiol. **14**, 370 (1965).

entstehende irreversible Schädigung der Zellen schliesst aber die Verwendung des Präparates für weitere Messungen an dieser Zelle aus.

Eine andere Möglichkeit liegt im Aufsuchen des Gewebekanals, der nach dem Entfernen der Mikroelektrode bleibt, oder darin, dass die Mikroelektrode im Gewebe belassen wird, oder auch im Abbrechen der Mikroelektrodenspitze im Gewebe³, worauf formolfixiert wird. Der Nachteil dieser Methoden ist ebenfalls ihre Ungenauigkeit, da mikroskopisch bestenfalls der Stichkanal in seinem dickeren Anteil lokalisiert werden kann, der Ort der Mikroelektrodenspitze aber unbestimmbar bleibt. Beim Abbrechen der Elektrodenspitze in situ wiederum besteht die Gefahr einer Gewebszerreissung durch das Mikrotommesser.

Grundsätzlich geeigneter sind Methoden, die die Metallelektrolyse oder Farbstoffelektrophorese ins Gewebe benützen. So verwendet man etwa bei Stahlmikroelektroden die elektrolitische Eisenabsplattung und ihren Nachweis durch die Berlinerblaureaktion^{4,5}. Diese Reaktion wird auch zum Nachweis der elektrophoretisch durch Glasmikroelektroden ins Gewebe injizierten Ferrocyanidionen verwendet⁶⁻⁸. Die Iontophorese von Silber-Ionen und ihre Reduktion durch Natriumthiosulphat wurde von OIKAWA et al.⁹ vorgeschlagen. GALIFRET et al.¹⁰ haben das Gewebe mit Hilfe eines komplexen Kupfer-Ions und von Zitraten markiert. WICKBOLDT et al.¹¹ benützen die Reaktion der elektrophoretisch applizierten Kupfer- und Rhodanid-Ionen.

Bei der Farbstoffelektrophorese verwendet man Kristallviolett¹², Lithiumkarmin¹³ oder Fluorescein². Doch diese Methoden sind nicht genau genug, einzelne Zellen zu markieren, da sie zu grosse Farbspuren im Gewebe bilden und damit die Mikroelektrodenspitze nicht ausreichend lokalisieren.

Einen Fortschritt bildet die intrazelluläre Farbstoffelektrophorese durch Methylblau oder Fast Green, die THOMAS et al.¹⁴ beim Rückenmarks-Motoneuron der Katze beschrieben haben. Die grosse Schnittdicke von 100 μ , die diese Autoren angeben, soll das Auffinden des markierten Punktes im histologischen Präparat erleichtern helfen. Bei der üblichen Schnittdicke für Zellfärbung (unter 10 μ) wäre die Anfertigung von lückenlosen Schnittserien notwendig, deren Durchsuchung mühsam, zeitraubend und häufig sogar ohne Erfolg ist. Dicke Schnitte haben andererseits den Nachteil, dass kleine oder wenig gefärbte Strukturen oft schwer zu identifizieren sind. Diese Technik des Schneidens ist überhaupt nicht sehr geeignet, wenn unbeschädigte Zellen benötigt werden (wie für quantitativ-zytologische Studien).

Zu diesem Zweck wurde die Plastik-Quetschmethode angewendet¹⁵. Diese Technik ermöglicht es, in kurzer Zeit aus einem etwa 3 mm³ grossen, frischen Gewebsblock ein Präparat zu verfertigen, dessen Zellen mit ihren Ausläufern unbeschädigt bleiben.

Zur Markierung der Elektrodenspitze wurde die Elektrophorese mit den üblichen in der Histologie gebräuchlichen Farbstoffen verwendet. In den hier wiedergegebenen Abbildungen wurde das durch seine neurophilen Eigenschaften seit langem bekannte Methylblau (EHRlich, CAJAL) elektrophoretisch appliziert. In die Hirnrinde der narkotisierten Ratte wurde mit einem Mikromanipulator eine Glasmikroelektrode, mit einer 3-M-KCl- und Methylblau-Lösung gefüllt, eingeführt. Diese Lösung wird auf folgende Weise verfertigt: Methylblau in Substanz wird bis zur Sättigung einer 3-M-KCl-Lösung beigegeben. Vor Gebrauch soll diese Lösung mindestens 24 h stehen. Dadurch verhindert man die Bildung von Methylblauaniederschlägen in der Mikroelektrode. Die

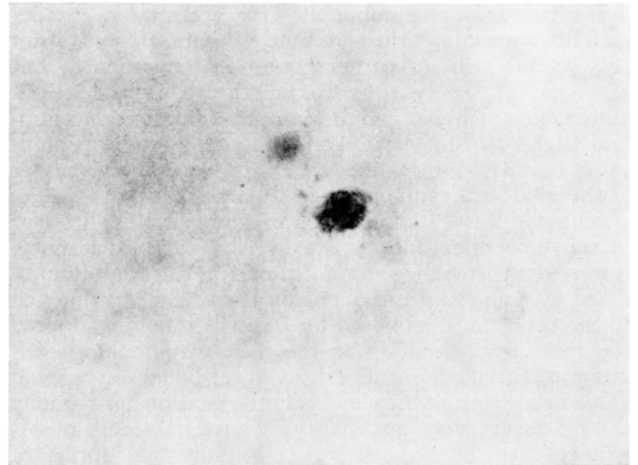


Fig. 1. Frontaler Kortex der Ratte. Auf dem Bilde befindet sich eine gefärbte Nervenzelle. Neben ihr liegt eine andere, die etwas weniger intensiv gefärbt ist. Die übrigen Nervenzellen sind nicht gefärbt. Farbstoff: Methylblau. Objektiv 40fach, Projektiv 4:1, Gesamtvergrösserung $\times 650$. Getrocknetes Quetschpräparat.

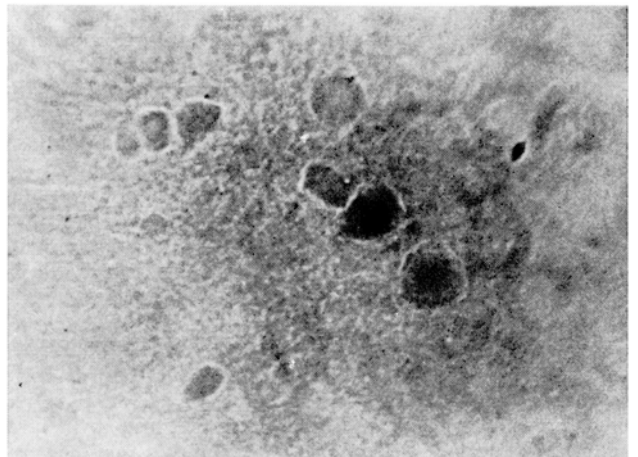


Fig. 2. Dasselbe Präparat im Phasenkontrast. Objektiv 40fach, Projektiv 4:1, $\times 650$.

³ C. GUZMAN, M. ALCARAZ und A. FERNANDEZ, Boln Inst. Estud. méd. biol. univ. nac. Méx. 16, 29 (1958).

⁴ M. E. SCHEIBEL und A. B. SCHEIBEL, Stain Technol. 31, 1 (1956).

⁵ J. D. GREEN, Nature 182, 962 (1958).

⁶ K. H. BULTITUDE, Q. Jl microsc. Sci. 99, 61 (1958).

⁷ T. TOMITA, M. MURAKAMI, Y. SATO und Y. HASHIMOTO, Jap. J. Physiol. 9, 63 (1959).

⁸ M. RAYPORT, Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol. 16, 104 (1957).

⁹ T. OIKAWA, T. OGAWA und K. MOTOKAWA, J. Neurophysiol. 22, 102 (1959).

¹⁰ Y. GALIFRET und T. SZABO, Nature 188, 1033 (1960).

¹¹ J. WICKBOLDT und M. BLANK, Pflügers Arch. ges. Physiol. 279, 23 (1964).

¹² E. F. MACNICHOL JR. und G. SVAETICHIN, Am. J. Ophthal. 46, P II, 26 (1958).

¹³ G. MITARAI, Proc. Japan Acad. 34, 299 (1958).

¹⁴ R. C. THOMAS und V. J. WILSON, Science 151, 1538 (1966).

¹⁵ W. SANDRITTER, J. PILNÝ, V. NOVÁKOVÁ und G. KIEFER, Histochemie 7, 1 (1966).

Lösung soll nicht filtriert werden, da der Farbstoff am Filterpapier zurückbleibt. Ein spontanes Austreten des Farbstoffes ins Gewebe findet bei dieser Konzentration nicht statt.

Der gewünschte Effekt wird dadurch erzielt, dass es an der Elektroden Spitze durch die Elektrophorese zur Konzentration von Methylenblau kommt (Konzentrations-effekt); während die Methylenblaulösung in der Glaskapillare hellblau ist, entsteht an der Mikroelektroden Spitze bei Stromdurchgang ein intensiv gefärbtes, dunkelblaues, scharf abgegrenztes, langsam wachsendes kugelförmiges Gebilde. Im getrockneten Quetschpräparat bleicht die Methylenblau markierung nicht mehr aus.

Der Aussendurchmesser unserer Mikroelektroden Spitze betrug im Durchschnitt $1\ \mu$, ihr Widerstand lag zwischen 5 und 10 Megohm. Die Mikroelektrode wurde mit dem positiven Pol einer Gleichspannungsquelle verbunden (da Methylenblau als Kation vorliegt), der negative Pol lag im Gewebe. Wird während 10 sec ein Strom von $3\ \mu\text{A}$ durchgeschickt (was einer Strommenge von $30\ \mu\text{Coul}$ entspricht), so bildet sich im Gewebe ein Farbfleck von etwa $10\ \mu$ Durchmesser, der die Zellen in unmittelbarer Nähe der Mikroelektroden Spitze anfärbt. Liegt die Elektroden Spitze intrazellulär, färbt sich nur diese einzige Zelle an. Es empfiehlt sich, den Strom langsam von 0 auf $3\ \mu\text{A}$ ansteigen zu lassen, da sich sonst Gasblasen bilden können, die die Mikroelektroden Spitze verstopfen. Man kann dies aber auch weitgehend dadurch vermeiden, dass man einen geringeren Strom ($0,5$ bis $1,5\ \mu\text{A}$) während mehrerer Minuten fließen lässt. Die Grösse dieses Farbfleckes hängt dabei nur von der Strommenge (Coulombs, d.h. Amperesekunden) ab, aber nicht von der Grösse der Mikroelektroden Spitze, somit auch nicht von deren Widerstand. Nach der Entfernung der Mikroelektrode

wird aus der Umgebung des Einstiches ein Gewebsblock von etwa $3\ \text{mm}^3$ ausgeschnitten und mit der Plastik-Quetschmethode weiter bearbeitet¹⁶ (Figur 1 und 2).

Die Methode ist einfach und gut reproduzierbar. Die physikalischen Eigenschaften der Mikroelektrode ändern sich durch die Füllung mit KCl-Methylenblaulösung und die elektrophoretische Injektion des Farbstoffes grundsätzlich nicht. Das ist eben für elektrophysiologische Versuche sehr wichtig.

Es ist zu hoffen, dass es gelingen wird, mit dieser kombinierten Methode von ein und derselben Zelle sowohl elektrophysiologische als auch morphologische und zytochemische Daten zu erhalten.

Summary. A method of electrophoretical marking of individual neurons with methylene blue by means of a glass micropipette (used in electrophysiology) is described. In combination with a new histological crushing technique, cytochemical analysis of whole undamaged cells thus marked can be correlated with electrophysiological findings in the same neuron.

J. ŠTERC¹⁶, J. PILNÝ,
H. PETSCHÉ¹⁷ und V. NOVÁKOVÁ

*Physiologisches Institut der Akademie der Wissenschaften, Praha 4 (Tschechoslowakei),
30. August 1967.*

¹⁶ Physiologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag.

¹⁷ Neurologisches Institut der Universität Wien.

Isolated Perfused Dog Spleen Method

In order to study postganglionic adrenergic mechanisms THOENEN et al.¹ described a method for perfusion of cat spleen in vitro. According to this method the isolated spleen, kept in a plethysmograph containing liquid paraffin, is perfused by means of a constant flow rate pump. Using this method, variations in neurotransmitter output may be correlated with changes in total spleen volume and in perfusion pressure.

A similar technique has been used by HERTTING et al.^{2,3} in the cat and by FARMER⁴ in the dog.

In the present paper an isolated dog spleen perfusion method is described which may present some advantages as compared with previously described techniques.

Method. Mongrel dogs weighing 5–8 kg are anaesthetized with pentobarbitone, $30\ \text{mg/kg}$, i.v. The abdomen is opened through a midline incision and the intestines removed from mid-duodenum to rectum. The vascular connections between the spleen and the stomach, omentum and pancreas are cut between ligatures.

The coeliac artery and portal vein are dissected from the surrounding tissues. After heparinization ($10\ \text{mg/kg}$ of a $50\ \text{mg/ml}$ heparine Roche solution i.v.) both blood vessels are ligated and cut. The spleen is removed and polyethylene catheters type PE 240 and PE 200, reinforced by short stainless steel tubes at the inside of their tip, are introduced into the artery and vein. The

spleen is immediately placed in the plethysmograph and perfused at constant pressure with a modified Krebs-Ringer bicarbonate solution ($\text{NaCl } 6.92\ \text{g}$ – $\text{NaHCO}_3\ 2.10\ \text{g}$, $\text{KCl } 0.35\ \text{g}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O } 0.29\ \text{g}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4\ 0.16\ \text{g}$, $\text{CaCl}_2\ 0.28\ \text{g}$, glucose $1.15\ \text{g}$, ascorbic acid $25\ \text{g}$, diaminoethanecetic acid disodium salt $10\ \text{mg/l}$). The pH of this solution is brought to 7.1 at 20°C by means of HCl, to reach a final pH of 7.4 at 37°C after saturation with carbogen ($95\%\ \text{O}_2 + 5\%\ \text{CO}_2$). After adjusting the venous outflow resistance at $4\ \text{cm H}_2\text{O}$, the arterial inflow pressure is regulated in order to obtain a perfusion flow of $20\ \text{ml/min}$. The perspex plethysmograph (Figure 1) consists of 2 parts: (a) the bottom part measuring $23 \times 13 \times 3\ \text{cm}$ and containing the heating tubes, 2 electrode passthroughs, passthroughs for both arterial and venous catheters, and a tube which permits evacuation of the liquid accumulated

¹ H. THOENEN, A. HÜRLIMANN and W. HAEFELY, *Helv. physiol. pharmac. Acta* 21, 17 (1963).

² G. HERTTING and Th. SCHIEFTHALER, *Arch. exp. Path. Pharmac.* 246, 13 (1963).

³ G. HERTTING, J. SUKO, S. WIDHALM and I. HARBICH, *Arch. exp. Path. Pharmac.* 256, 40 (1967).

⁴ J. B. FARMER, *J. Pharm. Pharmac.* 18, 767 (1966).