

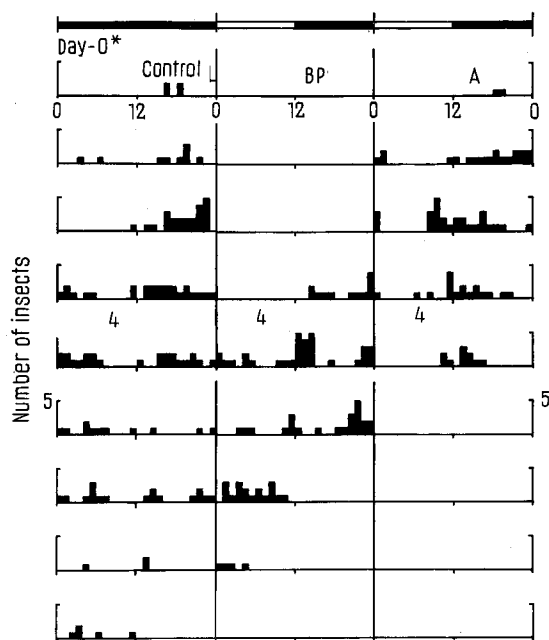


Fig. 3. Effect of a single 12-h light pulse (320 lux) on pigmented pupae (BP) and pre-emergent adults (A). Day 0 is the day the single 12 h light pulse was effected.

part, to the diagram and in part to the short period of emergence. Actually, emergence was continuous from 14.00 day 3 to 11.00 day 6, and shows no light pulse effect.

Single transients are evident in the emergence immediately following the temperature pulse which differs substantially from the recurrent intervals which follow. Such transients are common to most organisms whose rhythm is synchronized by a temperature shock and was anticipated in the bees.

The emergence of bees from populations exposed to LL, LD or DD regimes were not synchronized in the absence of temperature shock⁶.

Zusammenfassung. Erniedrigung der Temperatur auf 14°C erlaubt eine weitgehende Synchronisation des Schlüpfens der Imagines der Blattschneiderbiene *Megachile rotundata*. Die Lichtverhältnisse haben keinen Einfluss auf den Schlüpfrythmus.

D. G. TWEEDY and W. P. STEPHEN

Department of Entomology, Oregon State University, Corvallis (Oregon 97331, USA), 17 November 1969.

⁶ Technical Paper No. 2768 Oregon Agricultural Experiment Station. This work was supported in part by U.S. Public Health Service Grant No. 00040.

Influence of Medium Viscosity on the Oxygen Consumption of Rat Bone Marrow Cells

While dextrans and other large macromolecules have been used extensively for separation of blood cells¹⁻⁴, little is known about the effects of these large molecules on the metabolic activity of the separated cells. The large macromolecule dextran would be expected to produce changes in medium viscosity, cell volume, membrane hydration and because of this to influence metabolic activity. The possibility that medium viscosity⁵, and cell volume⁶, may alter cellular metabolic activity has been suggested.

Materials and methods. Male Holtzman rats, 42 ± 2 days age, were used in all experiments. Dextran solutions of 1, 3, and 5% 39,500 mol. wt. dextran (lot 8687, Pharmacia, Sweden) was used. 1, 3, and 5% dextran solutions in standard Tyrode's medium were also prepared using 139,000 mol. wt. clinical grade H dextran (lot H 1158, Pharmachem., Pennsylvania) and 228,000 mol. wt. clinical grade HH dextran (lot HH 82262, Pharmachem.). The osmolality of the different dextran solutions was adjusted to 310 mOsm/l with NaCl and the pH adjusted to 7.35. Determinations of cell counts and size were made on a Coulter Counter Model B coupled to a Model J Coulter chart recorder. Aliquots were placed in a Model 53 biological oxygen monitor for measurements of O_2 consumption at 37°C.

Results. Figure 1 shows the O_2 consumption of bone marrow cells in the various media used in this study. Stimulation of O_2 consumption of bone marrow cells occurred only in Tyrode's medium containing 3% 139,000 mol. wt. dextran. Figure 2 shows the viscosities of the different percent and mol. wt. dextrans employed.

Typical size distribution graphs of rat bone marrow cell populations registered by the Coulter counter plotter compromise 3 distinct groups (Figure 3). Differential counts and measurements showed that the bone marrow

cell population consisted of 3 groups. Group 1, mature erythrocytes and a small number of small lymphocytes; Group 2, nucleated RBC and lymphocytes; and Group 3, mature granulocytes and a few large blast cells forms.

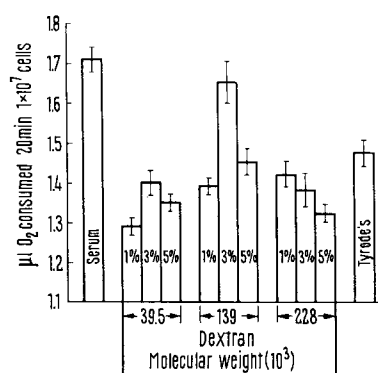


Fig. 1. Effect of different media on rat bone marrow oxygen consumption. Total cell concentration $8 \times 10^7/5$ ml medium. Each histogram bar represents the mean of 10 experiments. The lines indicate mean ± 2 S.E.

¹ W. A. SKOOG and W. S. BECK, Blood 11, 436 (1956).

² J. W. GOODMAN, Expl. Cell Res. 21, 88 (1960).

³ S. K. HILAL, D. G. MOSSER, M. K. LOKEN and R. W. JOHNSON, Ann. N.Y. Acad. Sci. 114, 661 (1964).

⁴ J. H. MORRISON, Br. J. Haemat. 13, 229 (1967).

⁵ C. J. HEDESKOV and V. ESMANN, Blood 28, 163 (1966).

⁶ R. M. GESINSKI, J. H. MORRISON and J. R. TOEPPER, Aust. J. biol. Sci. 21, 1319 (1968).

Figure 4 shows volume ranges of the 3 cell groups in the different molecular weights and percentages of dextrans used. Cell Group 1 had the most uniform cell volumes, with only cells suspended in the 3 and 5% 139,000 mol. wt. dextran showing any variation.

Group 2 cells suspended in the 1 and 5% 39,500 and the 1% 139,000 mol. wt. dextran media showed the greatest fluctuations in cell volume. Previous studies have shown cell Group 3 to be most susceptible to volume changes induced by osmolarity and ionic differences in suspending medium⁶.

Discussion. The data reported here indicate that cells in the 3 and 5% 139,000 mol. wt. dextran in Tyrode's medium have the highest O_2 consumption of bone marrow cells incubated in an artificial medium. Most probably the level of O_2 uptake by bone marrow cells in serum and the 3% 139,000 mol. wt. dextran is the result of different physiological effects of these two media.

Comparison of cell O_2 consumption in standard Tyrode's with and without added dextran allows one to

determine whether the effects of dextran are stimulatory or inhibitory. Dextran alters the viscosity of the suspending medium and displays colligative viscosity properties in solution; however, viscosity does not appear to be directly correlated with O_2 consumption of bone marrow cells in the system used where no liquid-gas interface exists.

If cellular O_2 consumption of bone marrow in serum is used as an index of the more 'natural physiological' condition, it must be concluded that a 3% solution of 139,000 mol. wt. dextran, in standard Tyrode's, is the choice incubation media for bone marrow cells. Although all the media combinations used had equal osmolarities, apparently the isotonicities were not similar. This is indicated by the variations in cell volume observed.

Since no correlation can be made of increase or decrease in cell volume with the amount of cellular O_2 consumption, one is left to consider cell membrane hydration. It is known that cell membrane hydration is important in maintaining cellular integrity and metabolism⁷. Variations in O_2 consumption of cells in the presence of dextran could well reflect a disturbance in membrane hydration. Since dextran molecules are highly hydrated and spherical in solution⁸, it could be that the hydration of the dextran molecule interferes with cell membrane hydration. GOOD⁹ has obtained indirect evidence that cell volume changes may be intimately connected with the effect of solutes on the lattice structure of water. It is quite

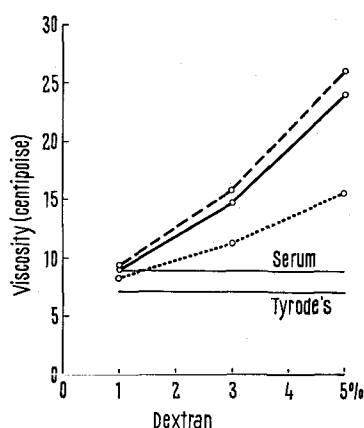


Fig. 2. Viscosities of dextran solutions (in standard Tyrode's medium) of varying molecular weight. Viscosities of standard Tyrode's and isologous rat serum are also shown. All determinations at 37°C. —, isologous rat serum; ---, standard Tyrode's balanced salt solution; ·····, 39,500 mol. wt. dextran in Tyrode's; ·—·, 139,000 mol. wt. dextran in Tyrode's; —·—, 228,000 mol. wt. dextran in Tyrode's.

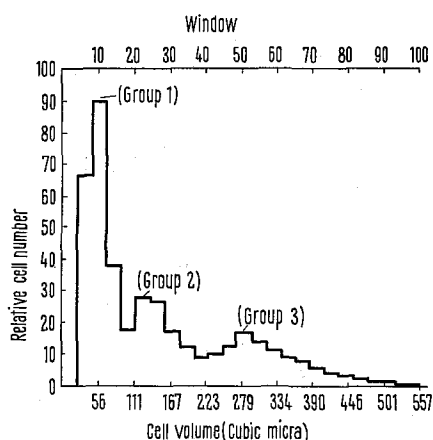
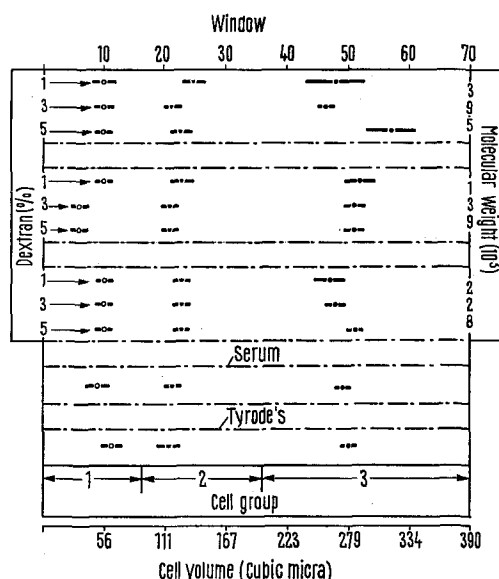


Fig. 3. Typical histogram of rat bone marrow cells in Tyrode's medium as obtained on Coulter counter plotter. The bone marrow cell population is classifiable into 3 major groups on the basis of the frequency distribution of cell sizes.



possible that membrane hydration is more directly involved in cellular metabolism than is commonly believed.

In view of the enhanced O_2 consumption of bone marrow cells incubated in the 3% 139,000 mol. wt. dextran in Tyrode's medium, it appears that size and concentration of the solute molecule is critical in cellular O_2 consumption. Because of the solvation properties of dextran this molecule would be expected to have marked influence on membrane hydration.

Zusammenfassung. Der Sauerstoffverbrauch von Knochenmarkszellen der Ratte in Thyrodelösung (verschiedene Konzentrationen und Molekulargewichte) wurde untersucht. Zwischen Sauerstoffverbrauch und Viskosität des suspendierenden Mediums oder des Volumens der Zellen

konnten keine Beziehungen gefunden werden. Mögliche physiologische Dextranwirkungen auf die Zellaktivität werden diskutiert.

R. M. GESINSKI, J. H. MORRISON,
J. R. TOEPFER¹⁰ and CH. V. RILEY

*Department of Biological Sciences,
Division of University Branches, Kent State University,
Kent (Ohio 44240, USA), 17 October 1969.*

¹⁰ Present address: Biology Department, Youngstown State University Youngstown (Ohio, USA).

La barrière capillaire enzymatique pour la DOPA au niveau de quelques noyaux du tronc cérébral du rat

Quelle qu'en soit la nature, il existe une barrière hématoencéphalique pour les monoamines¹. Pour leurs précurseurs, la Dopa en particulier, la décarboxylase (DC) de l'endothélium des capillaires cérébraux constitue une barrière enzymatique²⁻⁵. Elle est diminuée ou abolie par les inhibiteurs de la décarboxylase (I DC) ce qui facilite le passage de la Dopa dans le parenchyme cérébral^{3,4}. La barrière capillaire n'est pas égale dans toutes les régions du SNC. Elle peut être appréciée par la quantité d'IDC nécessaire pour l'abolir. Une cartographie des variations de l'action des IDC sur la barrière enzymatique pour la Dopa a été établie pour l'hypothalamus du rat⁶. Dans ce travail, nous étudions les variations de l'action des IDC sur cette barrière au niveau du tronc cérébral du rat.

Méthode. Dans une première expérimentation comprenant 11 animaux (rats albinos Wistar N.W. âgés de 8 à 10 semaines pesant de 200 à 250 g) prétraités par une dose fixe d'IMAO (Nialamid 250 mg/kg), nous avons administré des doses progressives (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 et 50 mg/kg) d'un IDC (Ro. IV 4602 = N1-(DL-Seryl)-N2-(2,3,4-trihydroxybenzyl-hydrazin) puis une dose fixe de L-Dopa 75 mg/kg. Animaux témoins (A) aucune drogue; (B) L-Dopa seule; (C) Nialamid + L-Dopa.

Dans une deuxième série de 10 animaux, nous avons répété la même expérience, mais sans prétraitement par le Nialamid. L'horaire de l'administration intrapéritonéale de ces différentes drogues était le suivant: 0 h Nialamid; 13.30 h Ro. IV-4602; 14.00 h L-Dopa; 15.00 h décapitation.

Les cerveaux de ces rats ont été lyophilisés et traités d'après la méthode histochimique pour l'observation des monoamines de FALCK⁷. Les blocs contenant les différentes parties du tronc cérébral ont été coupés en série avec montage d'une coupe sur 10. Les séries de préparations ainsi réalisées ont été comparées à la microscopie fluorescente.

Résultats. (a) Locus niger. A ce niveau déjà sans IDC on observe après administration de Dopa une légère augmentation de la fluorescence verte intraneuronale à côté de la fluorescence verte de l'endothélium capillaire. L'IDC administré à doses adéquates avant la Dopa abolit la fluorescence capillaire et augmente la fluorescence intraneuronale aussi bien dans la pars compacta que dans la pars reticulata (Figures 1 et 2). Avec 2 mg/kg d'IDC la

barrière n'est pas complètement abolie, on observe encore des capillaires fluorescents, mais il y a déjà une nette augmentation de la fluorescence intraneuronale par comparaison avec l'animal qui n'a pas reçu d'IDC. Avec 4 mg/kg d'IDC la barrière enzymatique est abolie et l'intensité de la fluorescence intraneuronale est déjà maximale. Des doses plus élevées d'IDC ne provoquent pas d'effet supplémentaire.

Les techniques classiques d'histologie avaient déjà permis d'observer au locus niger des contacts très étroits entre capillaires et corps neuronaux. Ce phénomène est bien visible aussi à la microscopie fluorescente après faible dose d'IDC et de L-Dopa; dans ces conditions en effet, les seules structures visibles sont les neurones à catécholamines et l'endothélium capillaire.

(b) Noyaux mésencéphaliques médians (A 10 de FALCK). Des constatations analogues concernant l'intensité de la barrière et les contacts neurones-capillaires ont été faites à ce niveau.

(c) Noyaux latéraux du pont et du bulbe. Pour ces structures à catécholamines intraneuronales l'IDC + Dopa provoque aussi une nette augmentation de la fluorescence péricaryonique, ceci déjà avant la disparition complète de la fluorescence endothéliale. Mais cette dernière ne disparaît qu'avec 10 mg/kg d'IDC.

(d) Locus coeruleus. Du fait de la densité des neurones fluorescents, il est difficile d'observer à ce niveau la fluorescence capillaire et d'apprécier son intensité. Aussi, est-il d'autant plus malaisé de déterminer la dose d'IDC par laquelle disparaît la fluorescence capillaire. D'autre

¹ H. WEIL-MALHERBE, J. AXELROD et R. TOMCHICK, *Science* 129, 1226 (1959).

² A. BERTLER, B. FALCK, C. OWMAN et C. ROSENGREN, *Pharmac. Rev.* 18, 369 (1966).

³ J. CONSTANTINIDIS, G. BARTHOLINI, R. TISSOT et A. PLETSCHER, *Helv. physiol. Acta* 25, 411 (1967).

⁴ J. CONSTANTINIDIS, G. BARTHOLINI, R. TISSOT et A. PLETSCHER, *Experientia* 24, 130 (1968).

⁵ C. OWMAN et E. ROSENGREN, *J. Neurochem.* 14, 547 (1967).

⁶ J. CONSTANTINIDIS, J. C. DE LA TORRE, R. TISSOT et F. GEISS-BÜHLER, *Psychopharmacologia* 15, 75 (1969).

⁷ B. FALCK et C. OWMAN, *Acta Univ. Lund* 2, 7 (1965).