

Résumé

Une modification de la méthode Loomis pour calibrer le manomètre Warburg est proposée. Cette modification rend la méthode plus rapide et plus exacte et, par conséquent, facilite la calibration. Dans cette modification les niveaux du mercure s'ajustent par action mécanique et il n'est donc pas nécessaire d'incliner le manomètre à la position désirée.

PRO EXPERIMENTIS

Zur Technik des histochemischen Nachweises von Esterasen

GOMORI¹ publizierte als erster eine Technik zur histiotopen Erfassung von Lipasen. Da sie wegen ihrer Einfachheit geeignet schien, entschlossen wir uns, die Reaktion einer Prüfung zu unterziehen und sie gegebenenfalls zu verbessern.

Auf Grund zahlreicher Zweifel (Literatur bei NACHLAS und SELIGMAN²) an der Spezifität der Reaktion untersuchten wir die Spaltung des beim histochemischen Nachweis verwendeten Substrates - Tween 60 - durch eine unspezifische Esterase (Leber) und eine Lipase (Pankreas) mit Hilfe elektropotentiometrischer Titrations. Aus diesen Bestimmungen ging eindeutig hervor, daß die Reaktion nicht nur für Lipasen spezifisch ist, sondern auch unspezifische Esterasen erfaßt, weshalb wir für diesen Nachweis die richtigere Bezeichnung einer «Esterasenreaktion» vorschlagen.

Mit der gleichen Methode (elektropotentiometrische Titration der Tween-60-Spaltung) untersuchten wir den Einfluß verschiedener Reaktionsbedingungen auf die Spaltung des Tween 60 und kamen zum Teil zu neuen Resultaten, die zu einer Verbesserung der histochemischen Methode ausgenützt werden konnten. So verzichteten wir unter anderem im Inkubationsgemisch auf den von GOMORI¹ angegebenen Zusatz von Glycerin und setzten die Inkubationstemperatur von 37°C auf 45°C hinauf. Durch diese Änderungen konnten wir die Inkubationszeit wesentlich verkürzen.

Wir bestimmten ferner mit demselben Verfahren die Aktivitätsverluste bei den verschiedenen Manipulationen, die zur Herstellung histologischer Präparate unumgänglich sind. So fanden wir zum Beispiel, daß bei dem von uns empfohlenen Paraffinschnittverfahren die erwähnten Aktivitätsverluste bis zu Beginn der Reaktion 25% der ursprünglichen Aktivität betragen.

Bei histochemischen Reaktionen ist als wichtige Fehlerquelle stets die Möglichkeit von Diffusionsvorgängen zu berücksichtigen. Wir konnten eine solche bei vorschriftsgemäßer Durchführung der Methode ausschließen, doch machten wir die Beobachtung, daß das Enzym bei unsorgfältigem Aufziehen und Trocknen der Schnitte sehr stark diffundieren kann.

Das ursprünglich von GOMORI vorgeschlagene Überziehen der Schnitte mit einem Kollodiumfilm¹ oder Durchtränken der ganzen Blöcke mit Azetylzellulose³ erwies sich als ungenügender Schutz vor Diffusion. Als sicherstes Verfahren fanden wir die Inkubation der nicht entparaffinierten Schnitte.

Außer dem Paraffinschnittverfahren bewährte sich für bestimmte Objekte auch das zuerst von SCHULTZ-BRAUNS¹ angegebene Messertiefkühlverfahren, das nach unserer Ansicht auch für andere histochemische Nachweisreaktionen geeignet sein dürfte.

Wir² bestimmten ferner mit einem neuen Verfahren die Sensibilitätsgrenze unserer Methode, die bei 20-25 µM Tween-60-Spaltung liegt (vgl. GOMORI³).

Des weiteren konnten wir eine Methode entwickeln⁴, die eine quantitative Auswertung der Reaktion erlaubt. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht in einem kolorimetrischen Vergleich der Reaktionsintensität im Präparat unbekannter Aktivität mit derjenigen eines Präparates bekannter Aktivität.

R. RICHTERICH

Anatomisches Institut der Universität Basel, den 15. Mai 1951.

Summary

A method for the demonstration of lipase activity *in situ* was given by GOMORI. The author examined the specificity of the reaction, the loss of lipolytic activity during the necessary manipulations (fixation, dehydration, etc.) and the various sources of error (diffusion, unspecific reactions, threshold value of the method). A few modifications of the original technique, e. g. the incubation of the non-deparaffined sections, were necessary for obtaining optimal results. Furthermore, a method for the quantitative estimation of lipolytic activity was developed.

¹ O. SCHULTZ-BRAUNS, Zbl. Path. 50, 273 (1931).

² R. RICHTERICH, Acta Anat. (im Druck).

³ G. GOMORI, J. Lab. and Clin. Med. 34, 275 (1949).

⁴ R. RICHTERICH, Exp. Cell Res. (im Druck); Enzymologia (im Druck).

PRO EXPERIMENTIS

Osservazioni sul dosaggio colorimetrico della chinurenina e di altri derivati del triptofano

Per il dosaggio colorimetrico della chinurenina e di altri derivati del triptofano OTANI, NISHINO e IMAI¹ hanno impiegato la reazione con *p*-dimetilaminobenzaldeide. Dopo aggiunta di H₂O₂ si ha sviluppo di una colorazione per un limitato numero di composti: nelle prove di OTANI e coll. soltanto per chinurenina, *o*-aminoacetofenone, acido antranilico, acido *p*-aminobenzoico.

Il colore ottenuto con la chinurenina rimane però nella fase acquosa anche dopo ripetute estrazioni con butanolo, mentre le altre colorazioni vengono estratte da detto solvente. Si ottiene così una reazione specifica e applicabile per un metodo di dosaggio colorimetrico, in quanto il colore segue la legge di LAMBERT BEER.

Noi abbiamo controllato tale metodica e confermato le conclusioni di OTANI e coll.; questi Autori avevano determinato la chinurenina nel plasma e in poltiglie di organi di animali trattati con triptofano, trovando sempre una buona rispondenza del metodo impiegato.

Proseguendo queste nostre ricerche dal 1947² e dovendo estendere l'indagine alla determinazione di altri metaboliti del triptofano, abbiamo dovuto saggiare con la sud-

¹ G. GOMORI, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 58, 362 (1945).

² M. M. NACHLAS and A. M. SELIGMAN, Anat. Rec. 105, 677 (1949).

³ G. GOMORI, Arch. Path. 41, 121 (1946).

¹ S. OTANI, N. NISHINO e K. IMAI, Z. Physiol. Chem. 270, 41 (1941).

² E. GINOULHIAC, Acta Vitaminol. 1, 12 (1947).