

radioactive phosphorus in active and inert bones¹. In Fig. 2 photomicrographs of microradiograms from cross sections of bone from dog A are shown. The difference in absorption between the primary and the

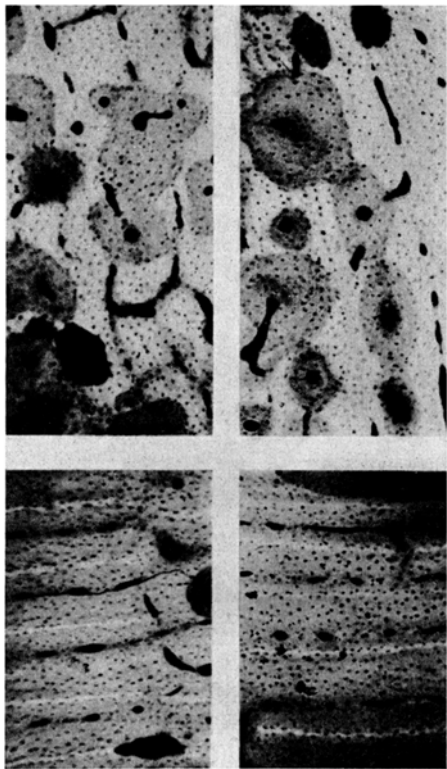


Fig. 2.

secondary bone and between different Haversian systems is apparent. When the sections were decalcified no contrast at all was obtained. Therefore the pictures show the distribution of mineral salts in the tissue.

Table III

Comparison between spacings in normally functioning and mechanically inert bones. Longitudinal sections

Ring	Spacing Å					
	Humerus Dog A		Radius Dog A		Metacarpus Dog B	
	Inert limb	Control limb	Inert limb	Control limb	Inert limb	Control limb
1			3.76	3.76	3.75	3.69
2	3.39	3.35	3.39	3.35	3.38	3.39
3			3.08	3.09	3.03	3.05
4	2.75	2.73	2.74	2.72	2.73	2.75
5			2.61	2.58	2.57	2.59
6	2.23	2.20	2.25	2.22	2.25	2.27
7			2.05	2.03	2.06	2.04
8	1.93	1.89	1.93	1.91	1.83	1.90
9	1.79	1.79	1.82	1.82	1.80	1.81
10	1.70	1.69	1.70	1.70	1.67	1.70

The results of the diffraction analysis are shown in Table III, which gives the spacings obtained from

¹ R.F.RILEY, B.McCLEARY, and R.E.JOHNSON, Amer. J. Physiol. 143, 677 (1945).

longitudinal sections. For the humerus of dog A only a few spacings are given, as the resolving power of the camera with such a small specimen to a film distance of 5.15 mm is small. The other diffractograms were taken with a specimen to a film distance of 9.85 mm. The orientation of the diffraction rings is the same in all diffractograms from longitudinal sections. In cross sections no orientation could be seen. In an extensive investigation BRANDENBERGER and SCHINZ¹ discussed the factors limiting the value of the diffraction method especially in the study of bone structures. Although the different apatite compounds possible in bone tissue show some slight difference in the X-ray diffraction picture, the results presented above tend to indicate that the ultrastructure of active as well as inactive bones is the same.

A. ENGSTRÖM and R. AMPRINO²

Department for Cell Research, Karolinska Institutet, Stockholm, January 15, 1950.

Zusammenfassung

Historradiographische und Röntgeninterferenzuntersuchungen ergaben, daß zwischen aktiven und immobilisierten Knochen keine Unterschiede in der Ultrastruktur und im Gehalt an Kalziumsalzen des HAVERSschen Systems bestehen.

¹ E.BRANDENBERGER and H.R.SCHINZ, Helv. med. acta (A), Suppl. XVI, Beil. 12 (1945-46).

² Rockefeller Research Fellow. Present address: Dept. of Anatomy, University of Torino, Italy.

Sur les protéines extractibles du muscle strié après traitement de la pulpe par quelques solvants organiques

Divers auteurs ont signalé la possibilité d'extraire des protéines musculaires douées de caractères particuliers, après traitement de la pulpe par des solvants organiques. C'est ainsi que STRAUB¹, en utilisant l'acétone, réussit à obtenir la G-actine et que BAILEY², en employant l'alcool-éther, prépara la tropomyosine.

Nous avons procédé à une étude, par la méthode d'électrophorèse (technique de TISELIUS-LONGSWORTH³), de la distribution des protéines dans des extraits de diverses forces ioniques obtenus après traitement de la pulpe par divers solvants organiques.

1° Si la pulpe musculaire hachée est traitée directement par l'acétone (3 lavages successifs avec 5 volumes d'acétone anhydre), séchée, puis extraite par 10 volumes de KCl m et si l'on dialyse cet extrait contre une solution contenant 0,048 m Na₂HPO₄, 0,006 m NaH₂PO₄ et 0,25 m NaCl (p_H ~ 7,4, µ 0,40), on obtient le cliché représenté fig. 1B, dont les gradients ont comme vitesses: à l'anode: M -1,5; A -4,4, T -5,6; à la cathode: M -1,35 et 2 autres: -3,85 et -4,7·10⁻⁵ cm/sec.

La fig. 1A correspond à la même pulpe, identiquement traitée par l'acétone, mais extraite ensuite avec un mélange de phosphates de µ 0,15 et de p_H 7,1. L'extrait est dialysé contre cette même solution avant l'électrophorèse.

¹ F.B.STRAUB, Stud. from the Inst. of med. Chem. Univ. Szeged 2, 3 (1942) et 2, 23 (1943); Hung. acta physiol. 1, 150 (1948).

² K.BAILEY, Nature (London) 157, 368 (1946); Bioch. J. 43, 271 et 279 (1948).

³ M.DUBUISSON et J.JACOB, Bull. Soc. roy. Sci. Liège 14, 133 (1945).

2° Si la pulpe est *préalablement lavée à l'eau* (3 lavages successifs avec 10 volumes H_2O , avant le traitement par l'acétone - ce qui élimine la plupart des protéines aisément extractibles, comme celles appartenant au groupe du myogène), on obtient une moindre quantité de la composante la plus lente (M) et une augmentation de T. (Celle-ci, à la frontière descendante se marque, par un accroissement de la surface du gradient cathodique de vitesse $-4,7 \cdot 10^{-5}$ cm/sec.)

3° Si l'alcool-éther (2 lavages avec 3 vol. d'alcool, puis 2 lavages avec 3 volumes d'éther) est utilisé en lieu et place de l'acétone dans les extraits des types 1 et 2 ci-dessus, les clichés obtenus sont identiques, mais les quantités de protéines extraites sont moins grandes pour tous les gradients. L'image obtenue est donc identique à la fig. 1, mais les gradients sont de surface moindre.

4° Comme les extraits du type 3 sont identiques à ceux dont part BAILEY pour préparer de la *tropomyosine*, celle-ci doit être représentée par l'un des gradients de la fig. 1. Afin de déterminer son emplacement, nous avons étudié, dans les mêmes conditions de dialyse et d'électrophorèse, un échantillon de la tropomyosine de BAILEY, très obligeamment fourni par cet auteur. Les clichés indiquent que la substance est homogène, dans les deux compartiments de la cellule à électrophorèse, et que sa vitesse, à μ 0,40 et p_H 7,3 est, à l'anode: de $-5,6$ et à la cathode de $-4,9 \cdot 10^{-5}$ cm/seconde. C'est la même vitesse que celle du gradient T de la fig. 1B. D'ailleurs, si l'on ajoute de la tropomyosine à un extrait du type 3, c'est bien la frontière T qui est augmentée. Le gradient T doit donc être celui de la tropomyosine.

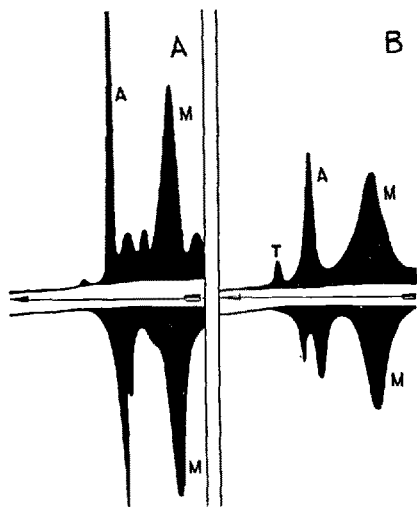


Fig. 1.

5° Si, *avant le traitement par l'acétone*, on enlève la myosine de la pulpe musculaire - en se plaçant dans des conditions identiques à celles que choisit STRAUB pour obtenir la pulpe sèche dont il extrait l'actine -, on peut obtenir celle-ci sous la forme monomère (G-actine) ou polymérisée (F-actine). Les vitesses électrocinétiques de la G-actine et de la F-actine sont très différentes, comme il a été établi précédemment (DUBUISSON¹). En comparant ces résultats avec ceux obtenus avec un extrait du type 1) ci-dessus, également préparé par traitement de la pulpe par l'acétone, *mais sans extraction préalable des myosines*, on est amené à constater que le gradient A de la fig. 1 doit correspondre à celui de l'actine *dépolymé-*

risée. Il s'ensuit que l'on peut extraire de l'actine d'une pulpe, qu'elle soit ou non débarrassée de sa myosine avant le traitement par l'acétone, mais que la véritable G-actine, *susceptible de polymérisation*, ne peut s'obtenir que lorsqu'on a enlevé la myosine du muscle; si l'on n'effectue pas préalablement cette opération, on obtient une actine qui possède les propriétés électrocinétiques de la G-actine, mais non susceptible de polymérisation.

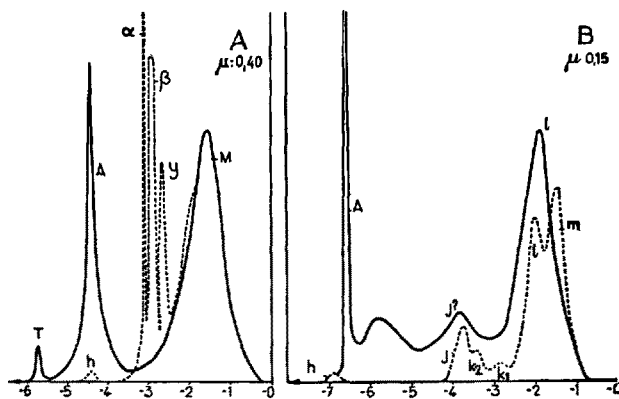


Fig. 2.

Nous avons sur la fig. 2 représenté les images électrophorétiques ascendantes obtenues, par dialyse dans les mêmes conditions, d'extraits de muscles traités (tracés en traits continus) ou non (tracés en traits interrompus) traités par les solvants organiques, à titre de comparaison. Les fig. 2A et 2B ne diffèrent que par la force ionique différente des extraits et des électrophorèses (μ 0,40 et 0,15).

Ces faits et diverses comparaisons entre un grand nombre d'extraits effectués dans des conditions différentes, mènent aux conclusions suivantes:

a) Lorsqu'on a épuisé, par de nombreux lavages à l'eau, le muscle de ses constituants aisément extractibles (myogène), le traitement subséquent par les solvants organiques (acétone ou alcool-éther) permet d'extraire à nouveau des protéines du groupe du myogène dont la vitesse est celle du gradient I de JACOB¹. Parmi ces protéines figure vraisemblablement la myokinase².

b) La pulpe traitée par les solvants organiques laisse extraire une certaine quantité d'actine. On obtient celle-ci, abondamment, sous une forme *dépolymérisée*, si les myosines n'ont pas été au préalable enlevées de la pulpe. S'il en est autrement, les solutions salines deviennent presque inefficaces par suite de la polymérisation de la G-actine *in loco et in situ* et seule l'eau, sans CO_2 , réussit à enlever une certaine portion de G-actine, polymérisable par les sels.

c) La pulpe traitée par l'acétone, sans lavage préalable par de l'eau, ne semble pas contenir de tropomyosine extractible (absence du gradient T).

d) La tropomyosine s'extraire en plus grande abondance d'une pulpe traitée par l'acétone que d'une pulpe traitée par l'alcool puis l'éther.

e) Le sulfure de carbone et l'éther de pétrole, utilisés en lieu et place de l'acétone ou de l'alcool-éther, donnent des résultats semblables, mais avec un rendement en protéines beaucoup plus faible.

M. DUBUISSON

Laboratoire de biologie générale, Faculté des sciences, Université de Liège, le 16 décembre 1949.

¹ J. JACOB, Bioch. J. 41, 83 (1947).

² A. DISTÈCHE, Nature 164, 70 (1949).

¹ M. DUBUISSON, Bioch. et biophysica acta, sous presse (1950).

Summary

(1) When most of the proteins of the myogen group have been extracted by washing the muscle with water, it is still possible, if the muscle tissue is dehydrated by acetone, to extract new proteins of the myogen group, among them myokinase.

(2) If the muscle tissue is dehydrated by acetone, when most of the proteins of the myosin group have been extracted previously by washing the muscle with Weber's solution, it is then possible to extract G-actin with water, and this protein can be polymerized into F-actin by salts. If the myosins have not been extracted first, the G-actin obtained does not polymerize.

(3) If the muscle tissue is dehydrated by alcohol + ether (or better by acetone), tropomyosin can be obtained only if the muscle tissue has been previously washed with water.

(4) If acetone—or alcohol ether—is replaced by carbon disulfide or protein ether, one gets similar results, but less protein is extracted.

Beitrag zur Analyse des postmortalen Verhaltens der Cochlearpotentiale

Das postmortale Schwinden der Cochlearpotentiale erfolgt bekanntlich in zwei Phasen, nämlich einer initialen Phase des raschen Abfalls und der anschließenden Phase einer wesentlich langsameren Abnahme der aus der initialen Phase resultierenden, vielfach auch als „*post mortem response*“ bezeichneten Restpotentiale (DAVIS¹ und Mitarbeiter, HALLPIKE und RAWDON-SMITH². Eine von WEVER und Mitarbeiter³ durchgeführte Untersuchung befaßte sich vorwiegend mit der zweiten Phase, zeigte aber auch, daß Steilheit und Ausmaß des initialen Potentialverlustes, vermutlich in Abhängigkeit von der Todesart, stark variieren. In eigenen Untersuchungen⁴ wurde ein rascher Potentialverlust bei Anoxämie festgestellt und die Identität dieser Erscheinung mit der initialen Phase des postmortalen Potentialschwundes vermutet. Die Befunde und Schlußfolgerungen der Verfasser stimmen diesbezüglich mit einer wenige Monate später veröffentlichten unabhängigen Untersuchung der gleichen Frage durch WEVER und Mitarbeiter⁵ vollständig überein. Da die Ergebnisse dieser und der eingangs erwähnten Autoren auf Grund punktförmiger Messungen gewonnen wurden und infolgedessen keine Einzelheiten der rasch verlaufenden initialen postmortalen Phase erkennen lassen, wurde versucht, mittels fortlaufender Registrierung genauere Aufschlüsse über Ausmaß und zeitlichen Verlauf der in dieser Phase erfolgenden Änderungen sowie über ihre Variabilität unter definierten Versuchsbedingungen zu erhalten.

Bei zwölf Meerschweinchen wurde in Urethannarkose (2,0 g/kg) das runde Fenster durch Eröffnung der Bulla freigelegt. Hierauf wurden während künstlicher Beatmung des Versuchstieres (Trachealkanüle und Starlingsche Atempumpe) Thorax und Herzbeutel unter Vermeidung stärkerer Blutung eröffnet und eine Fadenschlinge um die Aorta gelegt, jedoch nicht zugezogen. Die Amplitudengröße der

vom runden Fenster bzw. seiner Umgebung mittels chlorierter Silberelektroden abgeleiteten und am Kathodenstrahlzyllographen (vierstufige Verstärkung) dargestellten Potentiale wurde nach Kontrolle ihrer Konstanz mittels Photokymographion als Hüllkurve registriert (Filmgeschwindigkeit 3 mm/sec, Zeitschreibung 5 sec). Als Schallreiz wurde in allen Versuchen ein reiner Ton von 2800 Hz und 20 dyn/cm² (an Stelle des Ohres gemessen) verwendet, wobei die Größe der erhaltenen unbeeinflussten Potentiale in 4 Fällen (Ableitung von der Membran des runden Fensters) $240 \pm 38 \mu\text{V}$, in 8 Fällen (Ableitung von der knöchernen Umgebung des runden Fensters) $81 \pm 12 \mu\text{V}$ betrug. Etwa eine Minute nach Beginn der Registrierung wurde die um die Aorta gelegte Schlinge ruckartig zugezogen und der Zeitpunkt der Ligatur mittels Lichtsignal im Film markiert. 2 Minuten später wurde die Filmgeschwindigkeit verlangsamt, 10 Minuten nach der Ligatur die Registrierung beendet. Die bis zur Ligatur durchgeführte künstliche Beatmung erfolgte bei sechs Tieren mit Luft-O₂-Gemisch, bei den übrigen sechs Tieren mit einem N₂-O₂-Gemisch (6% O₂). In den letzteren Fällen wurde die Atemfrequenz zunächst allmählich verlangsamt, bis die Potentiale infolge der eintretenden Anoxie zu schwinden begannen, und hierauf soweit beschleunigt, daß eben Restitution der Potentiale erfolgte. Diese Versuchstiere befanden sich daher bei Beginn der Registrierung im Zustande einer sich in den Cochlearpotentialen noch nicht ausprägenden Hypoxie. Bei der Auswertung der registrierten Kurven wurde als Beginn des Potentialschwundes jeweils derjenige Zeitpunkt bestimmt, bei welchem ein Potentialverlust von 2% eingetreten war. Die Größe der relativen Änderungen wurde in der üblichen Weise in logarithmischem Maßstab (Dezibel) ausgedrückt, die statistische Auswertung der Ergebnisse (Kleinstichprobenverfahren, t-Test, F-Test) nach den Tabellen von LINDER¹ vorgenommen.

Während orientierende frühere Untersuchungen unter weniger definierten Bedingungen (Tötung des Tieres mittels Chloroform) einen annähernd S-förmigen Verlauf des initialen Potentialverlustes gezeigt hatten, wobei das maximale Gefälle der Kurven stark schwankte, setzte unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen der Potentialsturz bereits $3,2 \pm 0,9$ sec nach Ligatur der Aorta mit größter Steilheit ein und zeigte einen exponentialen Verlauf, indem er nach 30–60 sec merklich an Steilheit abnahm und nach 90–120 sec allmählich in die langsamer schwindende „*post mortem response*“ überging. Bemerkenswert war dabei das durchaus gleichartige Verhalten aller Tiere in der ersten Phase (Verlust 60 sec nach der Ligatur: $5,7 \pm 0,8$ db), während die Größe der „*post mortem response*“ eine wesentlich stärkere Streuung als der primäre Abfall zeigte (Verlust 5 min nach der Ligatur: $10,9 \pm 2,7$ db). Der Unterschied beider Streuungen war statistisch sicherzustellen ($P < 0,001$), gleichzeitig ergab sich eine schwach gesicherte positive Korrelation zwischen den Werten beider Zeitpunkte ($r = 0,61$; $P < 0,05$). Dies spricht für eine komplexe Natur der zwischen beiden Phasen bestehenden Beziehung. Zwischen den beiden Versuchsreihen (vor der Ligatur normal mit O₂ versorgt bzw. hypoxämisch) war kein signifikanter Unterschied nachzuweisen, was zusammen mit dem außerordentlich raschen Einsetzen des initialen Potentialschwundes (3,2 sec) auf das Fehlen nennenswerter ausnützbarer O₂-Reserven im Cortischen Organ schließen läßt.

H. BORNSCHEIN und F. KREJCI

Physiologisches Institut der Universität Wien und I. Universitätsklinik für Ohren-, Nasen- und Kehlkopfkrankheiten, Wien, den 10. Januar 1950.

Summary

The rapid initial drop of cochlear potentials after ligation of the aorta was investigated in twelve experiments on guinea-pigs. The loss began after 3.2 ± 0.9 sec

¹ A. LINDER, *Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure* (Birkhäuser, Basel 1945).

¹ H. DAVIS, A. J. DERBYSHIRE, M. H. LURIE und L. J. SAUL, *Amer. J. Physiol.* 107, 311 (1934).

² C. S. HALLPIKE und A. F. RAWDON-SMITH, *J. Physiol.* 81, 395 (1934).

³ E. G. WEVER, C. E. BRAY und M. LAWRENCE, *Ann. Otol. Rhinol. a. Laryngol.* 50, 317 (1941).

⁴ H. BORNSCHEIN und F. KREJCI, *Mschr. Ohrenheilk.* 83, 190 (1949).

⁵ E. G. WEVER, M. LAWRENCE, R. W. HEMPHILL und C. B. STRAUT, *Amer. J. Physiol.* 159, 199 (1949).