

In a decerebrate animal both hind limbs were denervated, leaving only the pure cutaneous nerves such as the sural and the saphenous, on the side of the leg to be used. The monosynaptic test volleys were continuously elicited from the central stump of the gastrocnemius nerve. By pinching the skin of the leg it proved possible to influence the amplitude of the test responses in a differential fashion by applying the stimulation to different areas of the skin. When pinching the skin over the heel, for example, a marked facilitation of the gastrocnemius motoneurones was obtained; but when a similar stimulation was applied to the surface over the ventral side of the ankle an equally prominent inhibition appeared.

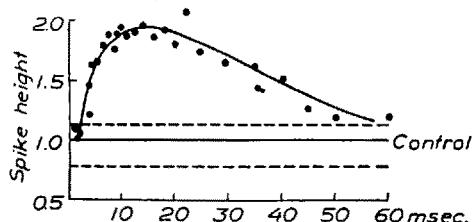


Fig. 2.—Decerebrated cat. Excitability changes of gastrocnemius motoneurones following a conditioning shock to a small cutaneous branch running over the heel.

In order to map out the facilitatory and inhibitory skin areas for the motoneurones of different muscles it was necessary to preserve all the skin afferents of the leg. Thus, in the experiment presented in figure 3, the innervation of the leg was left intact except for the gastrocnemius, the deep peroneal and the quadriceps nerve which were severed. From the central stumps of any of the latter nerves, monosynaptic test volleys could be evoked (the rectus component of the quadriceps had been removed). When pinching the skin great care was taken to ascertain that no movements of the leg or any other stimulation of deep afferents occurred.

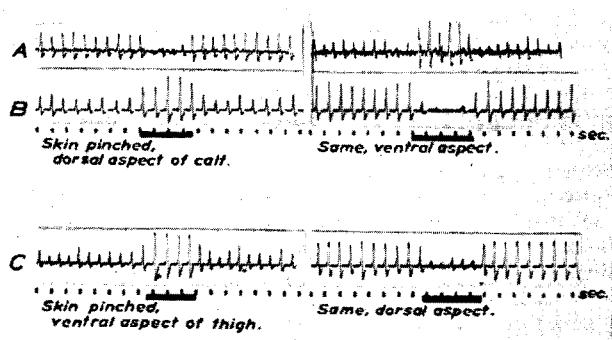


Fig. 3.—Decerebrated cat. Records (A and B) from the ventral root L_7 and (C) from the ventral root L_6 . Repeated monosynaptic test volleys obtained (A) from the deep peroneal nerve, (B) from the gastrocnemius nerve and (C) from the quadriceps nerve (the rectus component removed). By pinching the skin of the leg the excitability of the motoneurones is influenced and the effect is changed by varying the localisation of the skin stimulus. See text.

It was found that facilitation of the gastrocnemius motoneurones could be provoked from a skin area localized on the dorsal side of the leg and extending from about the middle of the thigh to just beneath the heel. From the surface of the rest of the leg, inhibition of the gastrocnemius motoneurones was obtained. The antagonistic flexor motoneurones (test shocks on the deep peroneal nerve) were influenced in the opposite way. They

were inhibited from the extensor facilitatory area just described, and facilitated from the rest of the leg. The results were quite constant and easy to repeat.

The extensor motoneurones of the quadriceps muscle were also influenced by pinching the skin. They were facilitated from the skin over the ventral side of the thigh and the knee and inhibited from other parts of the leg. The extensor facilitatory skin areas are mainly distributed over the extensor muscles concerned.

The skin stimuli employed have usually been mechanical and nocuous. But local heating to extreme temperatures (above $60-70^\circ\text{C}$) as well as moderate pressure on the skin were sometimes found to be adequate stimuli for the reflexes studied.

On the basis of the present investigation it is concluded that the reflex patterns which can be obtained from the extero-receptors of the limb are more complex than has generally been thought. The nature of the response is fundamentally determined by that particular skin area of the leg to which stimulation has been applied. For both flexor and extensor muscles, specific excitatory and inhibitory skin areas have been found. The end-organs responsible for these reactions are chiefly activated by nocuous stimuli (mechanical or thermal) but moderate pressure on the skin is also an adequate mode of stimulation. In the large cutaneous nerve trunks, leg afferents from different skin areas are intermingled, and, therefore, in the usual reflex work sensory units with very different reflex functions are indiscriminately activated by shocks to such nerves. The present results suggest that analytical penetration of the organization of skin reflexes has to be based on afferent selectivation. These results are part of a more extensive study which is in course of preparation.

K-E. HAGBARTH

Nobel Institute for Neurophysiology, Karolinska Institutet, Stockholm, January 31, 1951.

Zusammenfassung

Es wurden die ipsilateralen Reflexwirkungen von Hautafferenzen in der hinteren Extremität der Katze studiert. Es konnte gezeigt werden, daß in den großen Hautnervenstämmen sensorische Elemente mit verschiedenen Reflexfunktionen gemischt sind. Für Beuge- und Streckmuskeln wurden spezifische erregende und hemmende Hautareale gefunden.

PRO LABORATORIO

Méthode de dosage du ^{45}Ca et du ^{32}P au cours de l'emploi simultané des deux radioisotopes

Nombreux sont les importants travaux biochimiques utilisant le radiophosphore comme indicateur pour l'étude du métabolisme des tissus osseux. Pendant très longtemps, à cause de certaines difficultés d'ordre technique, on était limité à l'utilisation du radiophosphore pour l'étude de ces problèmes; mais à l'heure actuelle, il est possible de préparer du radiocalcium ayant des activités spécifiques suffisantes. Aussi différents auteurs ont déjà utilisé ce radioisotope au cours des recherches du métabolisme du calcium. Dans certains cas, il est important aussi de pouvoir faire le parallélisme entre le métabolisme du calcium et celui du phosphore. C'est dans le but de pouvoir faire cette compa-

raison, chez le même sujet, que ARMSTRONG et BARNUM¹ ont eu l'idée d'administrer, en même temps, le radio-calcium et le radiophosphore. Avant de faire les mesures radioactives, les auteurs séparent le calcium du phosphore par la méthode chimique suivante:

Les cendres résultant de la calcination des tissus à 500° sont dissoutes dans l'acide chlorhydrique dilué. Cette solution est additionnée d'un excès d'oxalate d'ammonium et centrifugée. Au liquide surnageant est ajoutée de l'ammoniaque jusqu'au pH 4 et la solution est encore centrifugée. Le pH de la solution surnageante est amené à 5 et le tube est centrifugé, après l'avoir laissé reposer pendant 24 heures. Le liquide surnageant et les eaux des deux lavages du précipité sont introduits dans un ballon jaugé. Cette solution renferme le radiophosphore. Le précipité d'oxalate de calcium est ensuite redissout et de nouveau précipité deux fois, avant de faire le dosage chimique du calcium et les mesures radioactives.

Cette technique a été suivie par les auteurs pour l'analyse de différents tissus ou organes renfermant des quantités plus ou moins importantes de calcium. De notre côté, nous avons essayé de reproduire la même technique pour le dosage du ^{45}Ca et du ^{32}P dans des échantillons renfermant très peu de calcium ou de phosphore et au cours d'expériences qui ne permettaient pas de prélever des quantités importantes de tissus ou d'excréta.

Ayant rencontré, dans ces conditions, de nombreuses difficultés et ayant observé des écarts appréciables dans les mesures, nous avons fait une étude systématique pour contrôler cette technique de dosage, et c'est ainsi que nous avons été conduit à mettre au point une nouvelle méthode de dosage du ^{45}Ca et ^{32}P , au cours de l'emploi simultané des deux radioisotopes. Pour ce faire, nous avons essayé de mettre à profit la très grande différence qui existe entre l'énergie des rayons bêta du ^{45}Ca et ceux du ^{32}P . Le principe de cette nouvelle méthode de dosage peut se résumer ainsi. Un écran mince en aluminium d'environ 0 mm 5 d'épaisseur suffit pour arrêter tous les rayons bêta de faible énergie du ^{45}Ca , tandis que ce même écran n'arrête qu'une petite partie des rayons bêta émis par le radiophosphore. Reprodui-

sant toujours les mêmes conditions géométriques près du tube compteur, nous pouvons tout d'abord déterminer, à l'aide d'une préparation ne contenant que du ^{32}P , la proportion des rayons bêta absorbés par cet écran en aluminium. Pour doser le ^{45}Ca et le ^{32}P dans un échantillon, il suffit de mesurer tout d'abord la radioactivité du mélange des deux radioisotopes, puis de faire une mesure avec interposition de l'écran en aluminium sur le trajet des rayons. La première mesure donne l'activité totale résultant des deux radioisotopes et la seconde, corrigée du facteur déterminé précédemment, nous donne l'activité due à la présence du radiophosphore. La différence donne l'activité due au radiocalcium.

Pour vérifier la validité d'une telle méthode et afin de la comparer avec la précédente, au point de vue de la précision, nous avons préparé une série de solutions (tableau 1) contenant, soit du ^{45}Ca (*G*), soit du ^{32}P (*E*), soit encore les deux radioisotopes ensemble (*A* à *D*). Nous avons également fait varier la quantité de support: très faible, elle est de l'ordre du gamma (10^{-6} g), très forte, elle est de l'ordre de 0 mg 1. Nous prélevons toujours la même partie aliquote pour chacune de ces solutions et les quantités de calcium et de phosphore correspondantes sont indiquées dans les colonnes 2 et 3 du tableau 1. Les solutions *A* à *D* renferment les mêmes quantités de radiophosphore ou de radiocalcium que les solutions *E* ou *G*. L'activité radioactive des solutions *A* à *D* est mesurée, d'abord, sans l'interposition d'aluminium, ensuite, avec interposition d'un écran en aluminium de 0 mm 5 d'épaisseur. Ces valeurs sont portées dans les colonnes 6 et 7. Les chiffres indiqués dans la colonne 8 représentent les quantités de radiophosphore calculées, après avoir déterminé expérimentalement que l'écran en aluminium absorbe 64,5 % des électrons émis par le radiophosphore.

D'autre part, les mêmes parties aliquotes de ces solutions sont traitées chimiquement pour séparer le phosphore du calcium par précipitation de ce dernier à l'état d'oxalate, ou bien, en suivant le mode opératoire décrit par ARMSTRONG et BARNUM (valeurs entre parenthèses). Les activités radioactives ainsi déterminées sont indiquées respectivement dans les colonnes 9 et 12 du tableau.

Ces valeurs représentent l'activité du précipité (^{45}Ca) ou du filtrat (^{32}P), déduction faite du radiophosphore ou du radiocalcium ayant été éventuellement

¹ W. D. ARMSTRONG et C. P. BARNUM, J. Biol. Chem. 172, 199 (1948).

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	
Solution	Ca (γ)	P (γ)		cpm ^{45}Ca	cpm ^{32}P		cpm $^{45}\text{Ca} + ^{32}\text{P}$ Omm. Al	cpm. ^{32}P calculé	cpm ^{32}P après séparation chimique	cpm ^{45}Ca entraîn ^e	cpm ^{45}Ca calculé par différence	cpm ^{45}Ca après séparation chimique	cpm ^{32}P entraîn ^e	$^{45}\text{Ca} + ^{32}\text{P}$ cpm activité totale retrouvée
<i>A</i>	7,4	192	765	672	1440	236	665	680 (736)	0 (111)	775	557 (471)	0 (0)	0 (1318)	
<i>B</i>	7,4	6	765	672	1342	210	592	490 (471)	65 (190)	750	589 (344)	141 (190)	1285 (1195)	
<i>C</i>	189	6	765	672	1443	237	668	509 (564)	0 (0)	775	705 (650)	241 (196)	1455 (1410)	
<i>D</i>	189	192	765	672	1465	247	697	674 (690)	0 (0)	768	744 (730)	0 (19)	1418 (1439)	
<i>E</i>	0	192	pas	672	—	—	—	630 (645)	0 (0)	—	0 (0)	0 (0)	—	
<i>G</i>	189	0	765	pas	—	—	—	0 (0)	0 (0)	—	730 (728)	0 (0)	—	
							moyenne: 656			moyenne: 767				

entraîné au cours de la séparation chimique; ces quantités entraînées ont été déterminées par des mesures d'absorption et les activités correspondantes sont portées dans les colonnes 10 et 13. Dans la colonne 14, sont indiquées les activités totales (^{45}Ca et ^{32}P) retrouvées après chacune des séparations chimiques. Chacune des valeurs indiquées dans le tableau est une moyenne des résultats obtenus au cours de trois ou quatre opérations.

Un examen d'ensemble du tableau montre que les quantités totales de radiocalcium et de radiophosphore retrouvées dans les différentes fractions représentent bien les quantités mises en expérience. De plus, quelque soit le mode de séparation chimique adopté, une partie du radioisotope échappe à la séparation chimique quand la quantité de support n'est pas suffisante. Enfin, il n'y a pas de radioactivité entraînée dans le cas des solutions *E* et *G*, ce qui prouve que les valeurs observées pour les autres solutions ne peuvent pas s'expliquer par une contamination survenue au cours de la manipulation.

De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que dans le cas de faibles quantités de calcium ou de phosphore stable, on obtient de meilleurs résultats, pour le dosage des radioisotopes correspondants, en adoptant la méthode basée sur la mesure d'absorption du rayonnement émis. Cette dernière méthode présente un autre avantage sérieux en faisant réaliser un gain de temps appréciable puisqu'elle supprime les très longues séparations chimiques. Enfin, signalons que le principe de cette méthode de dosage peut être appliqué aussi pour l'utilisation simultanée d'autres isotopes radioactifs.

En terminant, je tiens à remercier bien vivement M. le Prof. G. GUÉBEN pour l'aide que je lui dois. Mes remerciements vont également à Mles N. GRISARD et T. VOSSIUS pour l'aide technique reçue au cours de la réalisation de ce travail.

JEAN GOVAERTS

Institut de physique nucléaire de l'Université de Liège (Belgique), le 28 mars 1951.

Summary

A method is described by means of which radiocalcium and radiophosphorus can be used simultaneously in biological tracer work. The chemical separation is eliminated when the different beta energies of these two isotopes are used. An aluminium absorber of 0.5 mm stops all of the ^{45}Ca - β -rays, but reduces the activity of the ^{32}P by a factor of about 2.7. A sample containing both isotopes is first measured without absorber, giving the activity due to both isotopes; the activity measured with absorber multiplied by 2.7, will give the ^{32}P contribution; the ^{45}Ca contribution is then calculated from the difference.

Die Ausschaltung des Azetessigsäurefehlers bei der Brenztraubensäurebestimmung

Die auf dem Prinzip der Hydrazonbildung mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazinreagens beruhende Nachweismethode für Brenztraubensäure (BTS) nach LU¹, KLEIN², FRIEDEMANN und HAUGEN³ und anderen Autoren hat den Nachteil, daß die Reaktion für diese α -Ketosäure nicht spezifisch ist. Es reagieren vielmehr noch eine ganze Anzahl von anderen im Blut vorkommenden α -Ketosäuren, aber auch einige β -Ketosäuren unter Bil-

dung eines gefärbten 2,4-Dinitrophenylhydrazons. In der Literatur ist schon wiederholt darauf aufmerksam gemacht worden, daß speziell die Azetessigsäure als quantitativ am stärksten ins Gewicht fallende β -Ketosäure bei der Bestimmung der BTS stört. Deshalb wurden verschiedene Verfahren zur Eliminierung der Azetessigsäure ausgearbeitet. FRIEDEMANN und HAUGEN halten es für ausreichend, das trichloressigsäure Blutfiltrat über Nacht im Eis stehenzulassen, um den angeblich geringen Störungseffekt der Azetessigsäure zu beseitigen. KLEIN benützt zur Enteiweißung Wolframat-Schwefelsäure statt Trichloressigsäure und läßt das mit Äthylazetat extrahierte Hydrazon über Nacht stehen. ELGART und NELSON⁴ kochen nach Enteiweißung mit Wolframat-Schwefelsäure das Filtrat unter Zusatz von konzentrierter Salzsäure eine Stunde lang im Wasserbad. Dasselbe Verfahren, in leicht modifizierter Form, benutzen LESTRADET und GUEST⁵.

Wir haben uns im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über den BTS-Stoffwechsel bei der diabetischen Azidose die Frage vorgelegt, in welchem Maße die Azetessigsäure bei der BTS-Bestimmung nach FRIEDEMANN und HAUGEN Fehler verursachen kann. Die aus diesem Grunde vorgenommenen Bestimmungen zur Feststellung der Hydronbildung aus Azetessigsäure in wässriger Lösung sowie bei Zusatz zu Blut sind in der Tabelle I zusammengestellt.

Untersucht wurde der Dosenbereich von 100–1000 γ , das entspricht etwa einem Azetessigsäuregehalt des Blutes von 10–100 mg %. Wie die erhaltenen Werte zeigen, werden in wässriger Lösung zwischen 6,0 und 7,1% schwankende Azetessigsäuremengen als BTS nachgewiesen. Im Zusatzversuch zu Blut liegen die Werte mit 6,6 bis 8,0% etwas höher. Da bei der diabetischen Azidose eine stärkere Vermehrung der Azetessigsäure regelmäßig vorkommt, bedeutet die Ausschaltung dieses Fehlers bei der Bestimmung der BTS eine unbedingte Notwendigkeit.

Das von ELGART und NELSON vorgeschlagene Verfahren des einstündigen Kochens unter Zusatz von konzentrierter Salzsäure schien uns wegen der bekannten Empfindlichkeit der Ketosäuren gegen starke chemische Eingriffe ungeeignet. Wenn man das Blutfiltrat 1 Stunde lang der Hydrolyse in stark saurer Lösung bei 100° aussetzt, besteht die Gefahr unkontrollierbarer und tiefgreifender Zerstörungs- und Umwandlungsprozesse, die die nachfolgende Reaktion mit Dinitrophenylhydrazin unübersichtlicher machen.

Da anderseits die Azetessigsäure durch starke Zersetzung (unter Bildung von Azeton und Kohlensäure) in saurer Lösung beim Erwärmen charakterisiert ist, haben wir versucht, mit einer kürzeren Kochzeit auszukommen. Außerdem haben wir auf einen besonderen HCl-Zusatz verzichtet, denn bei der Enteiweißung mit Trichloressigsäure besteht bereits ein pH von 1. Diese Versuche ergaben das vollständige Verschwinden der Azetessigsäure schon nach 5 Minuten dauerndem Einstellen in kochendes Wasser (siehe Tabelle I). Papierchromatographische Nachprüfung hat ergeben, daß bei diesem Verfahren tatsächlich alle Azetessigsäure zerstört wird.

Weiter erhob sich die Frage, ob durch das fünfminutige Erwärmen auch Verluste an BTS verursacht werden. In Tabelle II und III sind die gefundenen Werte vor und nach der Kochprozedur angegeben. Es zeigt sich sowohl für die wässrige Lösung als auch für den BTS-Zusatz zum Blut, daß der Kochverlust unter 10 % beträgt. Wir

¹ G. D. LU, Biochem. J. 33, 249 (1939).

² D. KLEIN, J. Biol. Chem. 137, 311 (1941).

³ T. E. FRIEDEMANN und G. E. HAUGON, J. Biol. Chem. 147, 415 (1943).

⁴ S. ELGART und N. NELSON, J. Biol. Chem. 138, 443 (1941).

⁵ H. LESTRADET und G. M. GUEST, Presse méd. 59, 375 (1951); Ann. Biol. Clin. 9, 183 (1951).