

According to the present results, the amount of labelled mineral atoms which can be bound to the already calcified ground substance of a given bone seems to depend to a great extent on the relative amount of recently built and not yet fully calcified pieces of ground substance. Evidently the number of pieces of recently laid down bone tissue is greater the higher the rate of microscopic rebuilding. Thus, the activity of bones after treatment with radioactive elements should be greater the wider the reconstructive processes which occur in spongy and compact bone¹. In this respect, the differences of activity of the skeleton of young and of mature animals of the same species after administration of labelled Ca or P or of U, Sr, etc.², might depend—at least partly—on the well-known differences of the rebuilding rate of the skeleton in the various stages of life³.

The same reasoning might provide an explanation of the differences of radioactivity between diaphysis and epiphyses of long bones (cf. *i. al.*⁴); indeed, the rate of the microscopic reconstruction is higher throughout life in spongy bone of epiphyses and of metaphyses than in compact bone of diaphysis⁵.

R. AMPRINO

Institute of Anatomy, University of Turin, August 5, 1951.

Zusammenfassung

Dünnschliffe von frisch fixierten oder mazerierten Knochen wurden *in vitro* der Einwirkung von radioaktiven Ca- und P-Salzen unterworfen. Die Autoradiographien beweisen, daß Ca⁴⁵ und P³² in größerer Menge von den verhältnismäßig weniger kalzifizierten Abschnitten der Grundsubstanz des Knochens übernommen werden. Die Menge der anorganischen Salze, welche unter diesen Bedingungen von den verschiedenen Knochen aufgenommen wird, hängt hauptsächlich von der relativen Menge der vorhandenen organischen Substanzen und von den in der Grundsubstanz enthaltenen Osteomukoiden ab.

¹ R. AMPRINO, Arch. Sci. Biol. 31, 208 (1946).

² M. FALKENHEIM, W. F. NEUMAN, and H. HODGE, J. Biol. Chem. 169, 713 (1947).—W. F. NEUMAN, M. W. NEUMAN, and B. J. MURRY, J. Biol. Chem. 175, 705 (1948).—H. E. HARRISON and H. C. HARRISON, J. Biol. Chem. 185, 857 (1950).—N. S. MACDONALD, R. E. NUSBAUM, R. STEARNS *et al.*, J. Biol. Chem. 188, 137 (1951).—D. C. JONES and D. HAROLD COPP, J. Biol. Chem. 189, 509 (1951).

³ R. AMPRINO and A. BAIRATI, Z. Zellforsch. 24, 439 (1936).—R. AMPRINO and G. GODINA, Comm. Pont. Acad. Sci. 11, 329 (1947).

⁴ M. MANLY LEFEVRE and W. F. BALE, J. Biol. Chem. 129, 125 (1939).—R. S. MANLY, H. C. HODGE, and M. LEFEVRE MANLY, J. Biol. Chem. 134, 293 (1940).—G. CH. HEVESY, H. B. LEVI, and O. H. REBBE, Bioch. J. 34, 532 (1940).—W. F. NEUMAN and R. F. RILEY, J. Biol. Chem. 168, 545 (1947).—W. D. ARMSTRONG and C. P. BARNUM, J. Biol. Chem. 172, 199 (1948).—N. S. MACDONALD, R. E. NUSBAUM, R. STEARNS *et al.*, J. Biol. Chem. 188, 137 (1951).—P. LACROIX, R. DEVIS, and E. SCHICKS (in press).

⁵ R. AMPRINO, Monit. Zool. ital., Suppl. 56, 142 (1948).

L'utilisation du chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolum pour l'étude de l'activité déshydrogénasique des mitochondries

Le chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolum (TPT), obtenu par VON PECHMAN et RUNGE¹, est un dérivé incolore, très soluble dans l'eau, qui, sous l'action des réducteurs — inorganiques (hydrosulfite de sodium, sulfure d'ammonium, etc.) ou organiques — se transforme

en un corps fortement coloré en rouge, insoluble dans l'eau, soluble dans de nombreux solvants organiques, le triphénylformazan. Nous nous trouvons donc en présence d'un système dont la forme colorée est représentée par l'état réduit, fait particulièrement remarquable pour son utilisation en vue de la détermination des déshydrogénases.

Nous avons utilisé la méthode de GREEN (homogénéisation au mixeur, centrifugation dans une solution de KCl à 90/100)¹ pour la préparation de mitochondries (cyclophorase) de foie et de rein de rat et de lapin. La technique adoptée pour l'étude de l'activité déshydrogénasique est la suivante: à une quantité donnée de suspension de mitochondries (1 cm³), on ajoute un tampon phosphate 0,2 M à pH 7,3 (0,5 cm³), le substrat correspondant à l'enzyme à étudier et des activateurs variables selon les cas (MgCl₂, adénosinetriphosphate, etc.). Après avoir complété à un volume donné (3 cm³) par de l'eau bidistillée, on ajoute 1 cm³ d'une solution aqueuse de TPT à 0,1%. Il est indispensable d'utiliser une solution fraîchement préparée de TPT et maintenue à l'abri de la lumière. En effet, le TPT, très stable à l'état anhydre, s'altère en solution aqueuse sous l'action de la lumière qui, par une réaction d'oxydoréduction interne, le transforme en triphénylformazan et en chlorure de 2,3-(*o*-biphénylène)-5-phényltétrazolum². On porte au bain-marie à 37°C pendant 20 min et on extrait alors le formazan.

L'extraction de la totalité du colorant est difficile en raison de l'adsorption d'une partie de celui-ci sur les mitochondries. L'adjonction d'acides ou de bases forts décolore le formazan et est donc à rejeter. L'acétone (6 cm³) permet une extraction satisfaisante, à condition d'agiter fortement; l'adjonction d'acide trichloracétique (1 cm³ à 40%)³ n'est pas utilisable pour l'extraction du triphénylformazan, car elle décolore celui-ci. Les détergents (zéphyrol) ne facilitent pas l'extraction. En dehors de l'acétone, nous avons obtenu une excellente extraction par le mélange suivant: alcool éthylique, 5 cm³ + alcool nonylique (ou caprylique), 1 cm³.

Après adjonction du solvant, on agite, centrifuge, filtre et mesure l'absorption du filtrat à 492 mμ. Les lectures ont été faites à cette longueur d'onde à l'aide d'un spectrophotomètre de Beckman, modèle DU. Nous avons déterminé la courbe d'absorption du TPT et du triphénylformazan et trouvé qu'alors que le premier de ces corps n'absorbe pas dans le visible, le second (dissous dans un solvant organique, l'acétone par exemple) absorbe fortement entre 400 et 550 mμ, avec un maximum à 492 mμ ($\epsilon \times 10^{-3} = 14,9$). Dans l'ultraviolet, TPT et formazan (ce dernier dissous dans l'éther et non dans l'acétone vu la forte absorption de ce solvant) absorbent fortement au-dessous de 310 mμ, avec un maximum à 245 mμ pour le TPT et 295 mμ pour le formazan. Rejoignant les conclusions de KUN et ABOOD⁴, nous avons d'autre part établi que la densité optique des solutions de formazan est bien une fonction linéaire de la concentration, aussi bien dans le visible que dans l'ultraviolet. Ce fait permet donc aisément la détermination spectrophotométrique de la concentration en formazan.

Les lectures d'absorption doivent être faites peu de temps après la fin de la réaction. En effet, si le formazan est relativement stable en solution dans l'acétone ou

¹ D. E. GREEN, W. F. LOOMIS et V. H. AUERBACH, J. Biol. Chem. 172, 389 (1948).

² F. WEYGAND et I. FRANK, Z. Naturforsch. 3b, 377 (1948).

³ A. M. RUTENBURG, R. GOFSTEIN et A. M. SELIGMAN, Cancer Res. 10, 113 (1950).

⁴ E. KUN et L. G. ABOOD, Science 109, 144 (1949).

¹ H. VON PECHMANN et P. RUNGE, Ber. Dtsch. chem. Ges. 27, 2920 (1894).

l'éther purs (nous n'avons pas noté de modification importante de la densité optique de telles solutions après plusieurs jours), il n'en va pas de même lorsque, comme dans nos expériences enzymatiques, le formazan se trouve solubilisé dans un mélange eau-acétone contenant de nombreuses autres substances (substrat, activateurs, etc.). Dans ces expériences, nous avons constaté que le formazan se décolore assez rapidement et de façon irrégulière.

Quant à l'influence du pH sur la réduction du TPT, elle nous est apparue négligeable entre pH 4,0 et 12,5. Par contre, la réduction ne se fait plus que de façon incomplète au-dessous de pH 4,0.

L'utilisation de la méthode décrite nous a permis de classer les déshydrogénases étudiées de mitochondries de foie dans l'ordre suivant d'activité décroissante: citrico-, succino-, α -céto-glutar-, pyruvo-, malico-, lactico-déshydrogénase. Ces données ne sont cependant valables que lorsque la préparation a été faite avec un maximum de précautions (température suffisamment basse, rapidité des manipulations, absence de contact entre la préparation et les parties métalliques de l'homogénéiseur, etc.); sinon, l'altération de la préparation enzymatique se traduit par une réduction de l'activité de toutes les déshydrogénases; la succinodéshydrogénase étant la moins atteinte, son activité devient alors supérieure à celle de la citrico-déshydrogénase. Nous avons vérifié, en ce qui concerne la citricodéshydrogénase, que la formation de formazan (exprimée en microgrammes de formazan formés par gramme de tissu frais) est une fonction linéaire du temps dans les 60 premières minutes.

Nous avons enfin mené parallèlement aux déterminations par la méthode du TPT, des dosages d'activité des mêmes déshydrogénases par la méthode de Warburg et par celle de Thunberg (accepteur d'hydrogène: 1 cm³ d'une solution à 0,1 % de dichlorophénol-indophénol). Nous avons constaté ainsi l'absence de parallélisme entre les données de ces trois méthodes. La succinodéshydrogénase est, en effet, plus active que la citrico-déshydrogénase tant par les techniques de Warburg que par celle de Thunberg. Si ce fait n'a rien de surprenant en ce qui concerne la première (qui mesure toute une suite de réactions enzymatiques – dont les déshydrogénases ne sont qu'un maillon – aboutissant à l'utilisation d'oxygène moléculaire), la non-concordance des résultats entre les deux autres méthodes nous paraît devoir être attribuée à la nature même de l'accepteur, ainsi peut-être qu'à une inactivation partielle du complexe enzymatique au cours des manipulations nécessaires dans la technique de Thunberg¹.

En résumé, l'ensemble des propriétés physicochimiques du chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium que nous avons étudiées (coloration à l'état réduit, étendue de la bande de pH dans laquelle peut s'effectuer la réduction, validité de la loi de Beer-Lambert pour le formazan, etc.) nous a permis son utilisation pour la détermination de l'activité déshydrogénasique de mitochondries (cyclophorase) de foie de rat et de lapin. Nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux de déterminations menées parallèlement par les méthodes de Warburg et de Thunberg.

J. NORDMANN, R. NORDMANN et ODETTE GAUCHERY

Laboratoire de biochimie, clinique chirurgicale de la Salpêtrière, Paris, le 10 septembre 1951.

¹ J. NORDMANN, R. NORDMANN et O. GAUCHERY, Bull. Soc. Chim. biol. (sous presse).

Summary

The quantitative determination of dehydrogenase activity in mitochondria, using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as H-acceptor, is described. The results obtained with this technique are compared with those given by the methods of Warburg and Thunberg.

Über das Verschwinden von Adenosintriphosphat bei der Superpräzipitation von Aktomyosin-Gel

Obleich eine Reihe von Forschern die Ansicht vertritt¹, daß die durch Adenosintriphosphat (ATP) hervorgerufene Synärese («Kontraktion») von Aktomyosin (AM) mit einem Abbau dieses Nukleotids einhergeht, ist ein direkter Nachweis dieses Abbaus aus methodischen Gründen bisher nicht gelungen. Die interessanten Befunde BUCHTHAL'S², nach denen durch Einwirkung von ATP auf Fadenknäuel von AM-Gel ein relativ geringfügiger Einbau von Purin und Phosphat [etwa im gleichen Verhältnis wie in der Adenosindiphosphorsäure (ADP)] in das Myosin stattfindet, sind für das vorliegende Problem nicht heranzuziehen, da die lange Einwirkungsdauer vor der Analyse (etwa 30 min) über Vorgänge bei der Kontraktion selbst direkt nichts aussagt. Die größte Schwierigkeit ist wohl in der mit der «Kontraktion» gleichzeitig einsetzenden Wirkung der ATPase zu sehen³, die gleichfalls zum Verschwinden von ATP (durch Abbau zu ADP) führt. Zur Differenzierung zwischen Kontraktion und ATPase-Wirkung empfiehlt sich nach unseren Erfahrungen die Anwendung von SH-Gruppen blockierenden Substanzen [zum Beispiel metallorganischen Quecksilber(2)- und Arsen(3)-Verbindungen], mit deren Hilfe es gelingt, diese Vorgänge wahlweise und reversibel «einzufrieren»⁴; allerdings ist es uns bisher nie gelungen, bei erhaltener Kontraktion die ATPase auszuschalten. Mit der von uns früher⁵ angegebenen Methode der quantitativen Messung der AM-«Kontraktion» war der Einsatz der für die ATP-Bestimmung notwendigen Substanzmengen möglich. Für diese Bestimmung erwies sich die für ATP spezifische *Beeinflussung der Viskosität* von AM-Sol als ein auch in quantitativer Hinsicht geeignetes Verfahren⁶; denn die Länge des waagrechten Teils der Viskosität-Zeit-Kurve ist in Gegenwart von Magnesiumionen bei einer bestimmten ATPase-Aktivität des AM-Sols ein direktes Maß für die anfangs zugefügte ATP-Menge⁶. Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, verschwindet während der «Kontraktion» bei richtiger Dosierung das zugefügte ATP weitgehend, während im Kontrollversuch [bei dem *m*-Amino-*p*-oxyphenylarsen(III)-oxyd (oxarsan) die Kon-

¹ Vgl. zum Beispiel H. H. WEBER, Vortrag Bunsen-Tagung, 1951.

² F. BUCHTHAL, A. DEUTSCH, G. G. KNAPPEIS und A. MUNCH-PETERSEN, Acta physiol. Scand. 13, 167 (1947).

³ Abweichend von SZENT-GYÖRGYIS Befunden [vgl. zum Beispiel Hung. acta Physiol. 2, Nr. 1-4 (1949), zitiert nach ⁷], wonach nur kontrahiertes AM-Gel als magnesiumaktivierbare ATPase wirkt, finden wir in unseren Versuchen, daß auch nach Hemmung der Kontraktion durch die Arsen(3)-Verbindung Oxarsan die ATPase wirksam bleibt.

⁴ F. TURBA und G. KUSCHINSKY, Naturwissenschaften 37, 453 (1950). – Vgl. auch G. KUSCHINSKY und F. TURBA, Bioch. biophys. acta 6, 426 (1951).

⁵ G. KUSCHINSKY und F. TURBA, Biochem. Z. 321, 39 (1950).

⁶ G. KUSCHINSKY und F. TURBA, Bioch. biophys. Acta 6, 426 (1951). – Vgl. auch A. CSAPÓ, Acta physiol. Scand. 19, 101 (1949).

⁷ N. K. SARKAR, A. G. SZENT-GYÖRGYI und L. VARGA, Enzymologia 14, 267 (1950).