

eine genaue quantitative Bestimmung von ADP nicht möglich ist. Erst die neueren chromatographischen Verfahren gestatten auch eine saubere Analyse der ADP. So untersuchten MOMMAERTS und RUPP¹ mit Hilfe von Chromatographie an einem Anionenaustauscherharz den Nukleotidgehalt der Hinterbeinmuskeln von Fröschen in der Ruhe und nach Kontraktion in flüssiger Luft. Bei diesem Verfahren erhielten sie im Falle der Kontraktion eine starke Verminderung von ATP (im Mittel um $\frac{1}{5}$ des ATP-Gesamtgehaltes) und Zunahme von ADP und AMP. Bei Versuchen an Katzenherzen fanden KHAIRALLAH und MOMMAERTS² mit derselben Methode ähnlich wie in den oben angeführten Untersuchungen nach längerer Reizung eine Abnahme von ATP und wie WAJZER und NEKHOROCHEFF³ das Auftreten von IMP. Nach einer Einzelkontraktion in flüssiger Luft nahm ATP ebenfalls ab. Als Abbauprodukt geben die Verfasser neben ADP allerdings noch eine in ihrer Konstitution nicht bekannte Substanz an.

Dasselbe Problem – die Änderung des Nukleotidgehaltes von Muskeln in Ruhe und am Ende einer Einzelkontraktion – wurde für den Skelettmuskel am Beispiel des *M. rectus abdom.* von *R. esculenta* untersucht. Die Auslösung der Kontraktion erfolgte nicht durch Eintauchen des Muskels in flüssige Luft, sondern es wurde eine Methode ausgearbeitet, die es gestattet, die Untersuchungen bei jeder gewünschten Temperatur durchzuführen und die Kontraktion auf verschiedene Weisen (Pharmaka, elektrische Reizung) auszulösen. Nichtkontrahierte und kontrahierte Muskeln wurden in der gleichen Art behandelt: Sofortige Zerkleinerung mit schnell rotierenden Messern in 60%igem Alkohol und Trocknung der abzentrifugierten Alkohol-extrakte in gefrorenem Zustand (Lyophilisation). Der Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst, zur Beseitigung von Fetten mit Äther ausgeschüttelt und mit Hilfe von Hochspannungspapierionophorese (MICHL⁴) in m/10 Pyridinazetat, pH 6,5, vorgetrennt. Aus dem getrockneten Elektrophoresepapier wurden die einzelnen Nukleotidfraktionen wieder mit Wasser eluiert und zur besseren Identifizierung in 2 $\frac{1}{2}$ % Natriumzitat-Isoamylalkohol, pH 8,3, chromatographiert. Zur Kennzeichnung und quantitativen Bestimmung dienten Nukleotidpräparate des Handels als Vergleichssubstanzen, UV-Absorptionsspektren, P³²- und Ribosenachweis⁵.

Für Rektusmuskeln, die bei Zimmertemperatur in Froschtyrodelösung suspendiert waren, ergibt sich am Ende einer zum Beispiel durch Acetylcholin ausgelösten maximalen Kontraktion eine ATP-Abnahme um etwa 0,25 μ Mol/g Feuchtgewicht gegenüber ruhenden Muskeln mit einem ATP-Gehalt von im Mittel 1,91 μ Mol/g.

Im Gegensatz zu den Befunden von MOMMAERTS und RUPP beträgt die ATP-Verminderung während der Kontraktion höchstens $\frac{1}{8}$ des Ruhe-ATP-Gehalts. Gleichzeitig mit der ATP-Abnahme nimmt ADP in entsprechendem Masse zu. Eine AMP-Zunahme wurde

nur selten beobachtet. Nur bei Winterfröschen (*R. esculenta*) fand im kontrahierten Muskel immer auch eine Zunahme von AMP statt, und IMP, die im ruhenden Muskel nicht oder nur in Spuren vorhanden war, trat in Mengen von 0,4 μ Mol/g Feuchtgewicht auf.

Die Methode ist geeignet, kleinste Änderungen im Nukleotidgehalt von Muskeln zu erfassen. Die gemessenen Mengen geben aber nur den Gesamtgehalt der einzelnen Nukleotide an. Um nur die Änderungen des Anteils der ATP zu erfassen, der zu den kontraktile Proteinen in Beziehung steht, ist noch eine weitere Differenzierung notwendig.

G. LANGE

Pharmakologisches Institut der Universität Mainz, den 27. Januar 1954.

Summary

A method for the estimation of muscle nucleotides is described. The separation of nucleotides has been accomplished by paper ionophoresis at high voltages, as well as by paper chromatography. Even little changes in the nucleotide content such as the changes in a single muscular contraction can be well observed by this method.

A decrease of 0.25 μ M ATP/g/contraction (i.e. about $\frac{1}{8}$ of the normal ATP content) has been observed in a contracted muscle, when compared with the ATP content of the resting muscle.

PRO LABORATORIO

Appareil pour la mesure de la consommation d'oxygène des petits animaux de laboratoire

De très nombreux dispositifs destinés à la mesure de la consommation d'oxygène des petits animaux de laboratoire ont été décrits. Pour les travaux pratiques du Service de Physiologie, nous utilisons couramment l'appareil de FARNER et CRAMPTON¹ qui donne toute satisfaction. Au cours de recherches sur les troubles métaboliques provoqués par divers types de chocs chez le rat, nous avons été amenés à étudier les variations de la consommation d'oxygène chez les animaux d'expériences et à apporter des modifications assez importantes à l'appareil original de FARNER et CRAMPTON. Pour pouvoir suivre durant plusieurs heures avec certitude les modifications de la consommation d'oxygène, il était indispensable:

- 1° d'opérer à température constante,
- 2° de faire des mesures à des intervalles de temps rapprochés,
- 3° de maintenir dans l'enceinte où vit l'animal une teneur en oxygène aussi voisine que possible de la tension normale,
- 4° de troubler l'animal au minimum pendant la durée de l'expérience.

De l'appareil original de FARNER et CRAMPTON, nous n'avons retenu, en fait, que le principe de la burette servant à la mesure de la consommation d'oxygène.

A.—Description de l'appareil

La figure ci-jointe représente schématiquement le dispositif employé, qui comprend essentiellement:

¹ F. FARNER et E. CRAMPTON, Canad. J. Res. Section F. 26, 14 (1948).

¹ W. F. H. M. MOMMAERTS und J. C. RUPP, Nature 168, 957 (1951).

² P. A. KHAIRALLAH und W. F. H. M. MOMMAERTS, Circulation Res. [I] 1, 8 (1953).

³ I. WAJZER und I. NEKHOROCHEFF, Arch. Sci. physiol. 6, 233 (1952).

⁴ H. MICHL, Mh. Chemie 82, 489 (1951), vgl. auch B. KICKHÖFEN und O. WESTPHAL⁷.

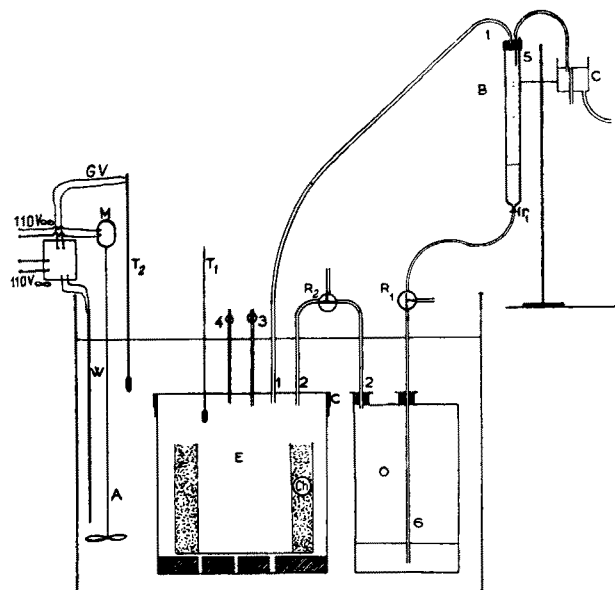
⁵ G. BERGOLD und L. PISTER, Z. Naturf. 3b, 332 (1948); C. H. FISKE und Y. SUBBAROW, J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).

⁶ H. K. BARRENSCHEEN und T. V. VALYI-NAGY, Z. Naturf. 4b, 203 (1949).

⁷ B. KICKHÖFEN und O. WESTPHAL, Z. Naturforsch. 7b, 655 (1952).

- 1° Une chambre étanche (E) où est placé l'animal,
- 2° La burette de mesure de la consommation d'oxygène (B),
- 3° Un réservoir d'oxygène pur (O),
- 4° Un thermostat contenant l'enceinte et la réserve d'oxygène.

1° *Chambre étanche (E)*. La chambre étanche est constituée par une cuve cylindrique en aluminium de 21 cm de diamètre et de 21 cm de hauteur, lestée par des morceaux de plomb. L'enceinte est fermée à sa partie supérieure par un couvercle en aluminium muni d'un rebord de 1 cm. L'étanchéité est assurée par une bande de caoutchouc souple. Le couvercle est garni de plusieurs tubulures. Le tube 1 unit la chambre étanche à la burette de mesure (B). Le tube 2 relie la chambre étanche à la réserve d'oxygène (O). Les tubes 3 et 4, munis de robinets, permettent de faire circuler de l'air atmosphérique dans la chambre en dehors des périodes de mesure. Un thermomètre au 1/10^e de degré (T_1) permet de contrôler la température de la chambre. Un récipient à chaux sodée (Ch), placé dans l'enceinte, permet d'absorber l'anhydride carbonique produit par l'animal. Ce récipient est fait de grillage fin, retenant la chaux sodée granulée.



Appareil pour la mesure de la consommation d'oxygène du rat.

Le rat est placé sur une plaque de plexiglas perforée disposée à 5 cm du fond de la chambre.

2° *Burette de mesure (B)*. La burette de mesure de la consommation d'oxygène est constituée par un tube de verre cylindrique de 40 cm de long et de 250 cm³ de capacité. Elle est graduée en cm³, de 0 à 200 cm³. L'extrémité inférieure du tube est effilée et munie d'un robinet r_1 . L'extrémité supérieure est fermée par un bouchon de caoutchouc garni de silicone. Ce bouchon est traversé par deux tubes. Le tube 1 relie la burette à la chambre étanche. Le tube 5 est un tube en U à extrémité effilée, fonctionnant comme siphon et s'alimentant dans un récipient (C) à niveau constant.

3° *Réservoir d'oxygène pur (O)*. La réserve d'oxygène pur (O) est mise dans un flacon de 500 cm³ à deux tubulures. Un tube de verre (6) pénètre par l'orifice médian et descend jusqu'au fond du récipient. Il est réuni, par l'intermédiaire d'un robinet à trois voies (R_1) au robinet r_1 de la burette de mesure. La seconde tubulure laisse

pénétrer jusqu'à l'affleurement un tube de verre (2) qui unit par l'intermédiaire d'un robinet à trois voies (R_2) le réservoir d'oxygène à la chambre étanche.

4° *Thermostat*. La chambre étanche et le réservoir d'oxygène sont immergés dans un thermostat rempli d'eau dont la température est maintenue constante par une résistance chauffante de 175 W (W). La régulation est assurée par un thermomètre à contact T_2 et un relai. Un agitateur A brasse continuellement l'eau du thermostat.

B. – Principe de la mesure

Lorsque le rat est placé dans la chambre étanche (les robinets R_1 , R_2 , 3 et 4 étant fermés), l'anhydride carbonique qu'il produit est fixé par la chaux sodée. Les échanges respiratoires de l'animal diminuent la tension partielle de l'oxygène dans la chambre. La légère dépression créée dans la burette B (2 mm d'eau) fait passer dans cette dernière, par l'intermédiaire du tube-siphon 5, un volume d'eau égal à celui de l'oxygène consommé. Lorsque l'extrémité du tube-siphon 5 placée dans la burette est correctement effilée, il n'y a aucune inertie dans le dispositif. En faisant varier la hauteur du récipient C par rapport à la burette B, il est aisé de trouver une position pour laquelle le siphon ne se désamorce pas et ne cause pas non plus d'écoulement permanent. Lorsqu'une mesure de consommation d'oxygène est terminée, on ouvre les robinets R_1 et R_2 de telle manière que l'eau contenue dans la burette B puisse s'écouler dans le fond du réservoir (O), faisant passer automatiquement dans la chambre (E) un volume égal d'oxygène. Lorsqu'après un certain nombre de mesures, le flacon (O) est plein d'eau, on place les robinets R_1 et R_2 en position telle que le réservoir (O) communique avec l'air extérieur. On branche alors une bombe d'oxygène sur la tubulure latérale du robinet R_2 . L'eau est chassée par la tubulure latérale du robinet R_1 au fur et à mesure que le réservoir se remplit d'oxygène.

C. – Mesure de la consommation d'oxygène

Il est indiqué de laisser l'appareil chauffer à vide durant quelques heures. Lorsque l'équilibre thermique est établi, la température de l'enceinte (E) ne varie pas au delà de 1/10 de degré centigrade en une heure.

Le rat est introduit dans la chambre et cette dernière est rapidement fermée. On attend que l'équilibre de température soit atteint à nouveau pour commencer les mesures. L'enceinte est mise en communication avec la burette par le tube 1. Au bout de quelques minutes, un écoulement d'eau par le siphon indique que le dispositif fonctionne normalement.

On note le temps où le ménisque atteint la graduation 0 de la burette et on commence alors les mesures. Deux techniques peuvent être employées. On peut soit déterminer successivement les temps nécessaires à l'animal pour consommer un volume donné d'oxygène, soit mesurer les volumes d'oxygène consommés pendant un intervalle de temps constant. La première technique présente l'avantage de garder les animaux sous une même tension d'oxygène au cours d'expériences successives.

Durant les intervalles des mesures, on supprime les connexions de la chambre étanche avec la burette et le réservoir d'oxygène. On ouvre les robinets 3 et 4 et l'un d'eux est branché sur une trompe à eau. Un courant d'air est ainsi établi à l'intérieur de l'enceinte. Les résultats obtenus à l'aide de cet appareil chez le rat normal et chez le rat choqué seront publiés ultérieurement.

Nous remercions D. CORDIER de nous avoir aidé de ses conseils durant la mise au point de ce dispositif.

H. LEMARCHANDS

Laboratoire de physiologie générale, Faculté des Sciences, Université de Lyon, le 14 décembre 1953.

Summary

An apparatus has been described for measuring oxygen consumption in small animals. In this apparatus, the temperature changes are very small, the determinations of oxygen consumption are rapid and frequent, the oxygen tension is normal and the animals are in a good state of quietness.

DISPUTANDUM

Zur Wirkung von Colchiceinamiden an Zellen *in vitro* und *in vivo*

In einer eben erschienenen Arbeit erwähnen MEIER, SCHÄR und NEIPP¹, dass sie keine stärkere Wirkung des Colchicein-mono-methylamids im Vergleich zum Colchicin an *in vitro* gezüchteten Fibroblasten feststellen konnten. Diese von mir 1941 hergestellte Verbindung² (in Anlehnung an ZEISELS³ Colchicamid als N-Methylcolchicamid, NMC, bezeichnet) erwies sich im Test mit dem Mäuse-Ascites-Tumor⁴ als etwa 3mal stärker wirksam als Colchicin⁵; gleiches gilt für ihre Wirkung an *in vitro* gezüchteten Fibroblasten (vgl. Tab.)⁶. Da wir Colchicin und NMC als Standardsubstanzen zum Vergleich mit anderen chemischen Faktoren routinemässig verwenden, sind diese Befunde in den letzten Jahren laufend reproduziert worden⁷ und müssen daher in vollem Umfang aufrechterhalten werden.

¹ R. MEIER, B. SCHÄR und L. NEIPP, Exper. 10, 74 (1954).
² H. LETTRÉ, DRP.-Anmeldung vom 24. März 1942. – Angew. Chem. 55, 265 (1942).
³ S. ZEISEL, Mh. Chem. 9, 1 (1888).
⁴ H. LETTRÉ, Z. physiol. Chem. 268, 59 (1941).
⁵ H. LETTRÉ, Z. Krebsforsch. 57, 1 (1950). – H. LETTRÉ, R. KRAPP und M. OCHSENSCHLÄGER, Z. Krebsforsch. 57, 142 (1950).
⁶ H. LETTRÉ, R. LETTRÉ und CH. PFLANZ, Z. physiol. Chem. 286, 138 (1950).
⁷ Zum Beispiel H. LETTRÉ, R. LETTRÉ und CH. PFLANZ, Z. physiol. Chem. 287, 150 (1951). – H. LETTRÉ und W. BERGDOLT, Z. Krebs-

Prozentzahl der Mitosen in Fibroblastenkulturen *in vitro*, 24 h gewachsen, bei Zusatz von

Colchicin		Colchicein-monomethylamid	
Dosis (γ/ml)	Mitosen	Dosis (γ/ml)	Mitosen
0	1,9	0	1,9
0,005	1,5	0,001	2,6
0,008	3,5	0,002	3,9
0,01	5,5	0,004	10,0
0,02	27,0	0,008	40,6
0,04	54,6	0,01	54

Die unterschiedlichen Feststellungen von MEIER, SCHÄR und NEIPP¹ können bedingt sein durch eine unterschiedliche Reaktionsweise verschiedener Zellarten, wofür wir heute, speziell bei Tumoren, eine Reihe von Beispielen kennen². Dass die von MEIER, SCHÄR und NEIPP¹ verwendeten Hühnergefäßfibroblasten so unterschiedlich von den von uns früher verwendeten Hühnerherzfibroblasten und den seit 1949 verwendeten periostalen Hühnerfibroblasten sein sollten, ist unwahrscheinlich. Wesentlicher erscheint mir die unterschiedliche Technik: wir setzen die zu prüfende Substanz unmittelbar beim Ansetzen der Kultur dem Medium zu und fixieren die Kulturen nach 24stündigem Wachstum. Die in der Tabelle angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus mindestens 6 Versuchskulturen. MEIER, SCHÄR und NEIPP¹ überschichten die 24 h ohne Zusatz gewachsenen Kulturen mit der Lösung der zu prüfenden Substanz und werten 8 h nach diesem Zusatz aus.

H. LETTRÉ

Aus dem Institut für experimentelle Krebsforschung der Universität Heidelberg, den 25. Februar 1954.

Summary

Colchiceine-N-mono-methylamide is 3–4 times as active as colchicine as shown by its effect on the mouse-ascites-tumor (EHRlich) and on fibroblasts *in vitro*.

forsch. 59, 68 (1953). – H. GROPP, Z. Krebsforsch., im Druck. – R. KAUF und J. MAIER, Z. Krebsforsch. (im Druck).
¹ R. MEIER, B. SCHÄR und L. NEIPP, Exper. 10, 74 (1954).
² Vgl. H. LETTRÉ, Z. Krebsforsch. 59, 568 (1953).