

segment and left in the cord for subsequent histological control of the needle track; the various depths from which recording was made during the course of the experiment were estimated with a micrometer gauge. The intracellularly recorded interneuron activity could be distinguished from similarly recorded motoneuron potentials by the absence of the typical propagated response to antidromic ventral root stimulation described by BROCK, COOMBS and ECCLES¹, and was further identified by characteristic spike forms and discharge pattern². To electric single shock stimulation of the dorsal root, the ventral horn interneuron responds—following stimulus rates up to 20–30 per s—with a single spike or a series of up to 6 or 7 discharges depending upon the stimulus strength; minimum latency observed was 1.0 ms. The average values of the membrane potentials varied between 40 and 60 MV, the spikes amounting to about 80% of these values. Occasionally membrane potential values as high as 80 MV were observed in combination with spike potentials overshooting about 10%, apparently representing ideal recording conditions. The average duration of the spike potential was 0.7 ms. (cf. WOODBURY and PATTON's³ data for type II units).

The functional analysis has been based on successful recordings from about 200 ventral horn interneurons, the resting potential values of which kept constant during 5 up to 40 min. Adequate stimulation of various extero- and proprioceptive receptors as well as electrical stimulation of different muscle and skin nerves was used. Some of the cells investigated discharged only after application of afferent stimuli, while others maintained a continuous, more or less regular discharge of maximally 50–60 per s. Whether pre-existent or induced from some known source, the interneuron activity could be either increased in frequency (up to more than 200 per s) or reduced (down to zero) by afferent stimulation. According to the pattern of response to various types of afferent inflow, a functional classification of the neurons could be made. Under given experimental conditions, certain cells were exclusively activated by the afferent inflow from one muscle (or group of synergistic muscles); others could be influenced from two or more functionally different muscles, while a great number of interneurons showed a convergence from exteroceptive (touch, pressure, pain) as well as proprioceptive sources on both ipsi- and contralateral sides. Cells responding only to exteroceptive stimuli were comparatively scarce in the ventral part of the cord. An example of a common type of response pattern is the following: the discharge frequency of a continuously firing interneuron was increased by stretch of the ipsilateral quadriceps muscle as well as by pressure applied to the contralateral pad, the two stimuli eventually summing, while an equal stimulation of the ipsilateral pad caused a decrease of the prevailing discharge rhythm, at a more intense stimulus strength leading to complete cessation of the spike activity. Descending activity from suprasegmental levels, originating e.g. from receptive areas of the foreleg, was observed to converge on the same neuron. Cells of reciprocal behaviour were situated adjacent to the cell described, an arrangement apparently characteristic of the organisation of the interneuron system studied. Not only with natural but also with artificial stimulation,

facilitatory and inhibitory processes in terms of modulation of discharge frequency were observed; thus for instance interneuron discharge maintained by afferent inflow from the gastrocnemius muscle was inhibited by electric stimulation of the sural nerve.

Data available from experiments with intracellular recordings on motor cells under identical stimulus conditions¹ indicate that mediation of activity from the interneurons is responsible for the excitation of near-by motor cells. Under these premises it is obvious that mere cessation of the interneuron activity constitutes an effective inhibitory mechanism in segmental reflex processes.

The interneurons studied were found to be susceptible to certain changes in the chemical milieu: diethyl p-nitrophenyl phosphate, an irreversible cholinesterase inhibitor, elicited bursts of discharges followed by a lowered excitability; also a decrease of the resting potential value was observed. Noradrenaline intrarterially injected in doses of a few μ g per kg body-weight was observed to influence the discharge rhythm and also to change the response pattern of a given cell so that previously non-active afferent sources became effective. The direct recording of such changes in anatomically and functionally defined interneurons reveals obvious mechanisms for the effects of these substances on spinal reflexes, but, as emphasized in connection with similar studies on the frog's spinal cord², the demonstration of effects on interneuron activity *per se* does not exclude other sites of primary action.

G. M. KOLMODIN and C. R. SKOGLUND

Department of Physiology, Karolinska Institutet, Stockholm 60, June 26, 1954.

Zusammenfassung

Mit intrazellulären Elektroden wurden an der Katze die Funktionen der Zwischenneuronen im Vorderhorn des 7. Lumbalsegments des Rückenmarks untersucht und ihre elektrischen Eigenschaften kurz erwähnt. Auf Grund ihrer Reaktion auf adäquate afferente Reizung konnten die einzelnen Neuronen klassifiziert werden; sowohl Erregungs- wie Hemmungsprozesse – wie sie als Frequenzänderungen der Aktionspotentiale zum Ausdruck kommen – wurden demonstriert. Einige bei chemischen Milieuveränderungen bewirkte Effekte wurden auch studiert.

¹ G. M. KOLMODIN, unpublished results.

² G. M. KOLMODIN and C. R. SKOGLUND, *Acta phys. scand.* 29, Suppl. 106, 503 (1953).

PRO EXPERIMENTIS

Die Säurefällung der Serumproteine¹

Die Prüfung des Filtrates von mit Säure geflocktem Serum¹ zeigt, dass die Fällung nur beim erhitzten Ansatz vollständig ist. Um festzustellen, welcher Anteil des Nativserums durch die Säuerung ausfällt und worauf die Veränderungen durch Hitze beruhen, wurden 5mal (Abb. 1–4: a–e) 5 ml Serum 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und jeweils gekocht und roh mit soviel $n/100$ HCl versetzt, dass eine lineare Säureverdünnungsreihe zwischen den Punkten der beginnenden Trübung und kurz vor der völligen Klärung resultierte. Die Sedimente wur-

¹ L. B. BROCK, J. S. COOMBS, and J. C. ECCLES, *J. Physiol.* 117, 431 (1952).

² J. W. WOODBURY and H. D. PATTON, *Sympos. Quant. Biol.* 17, 185 (1952).

³ J. W. WOODBURY and H. D. PATTON, *Sympos. Quant. Biol.* 17, 185 (1952).

¹ K. SIMON, *Exper.* 8, 55 (1952).

den abzentrifugiert und durch Zugabe von je 0,2 ml Michaelis-Puffer gelöst. Die Überstände wurden durch äquivalente Mengen $n/10$ NaOH neutralisiert und alle Proben mit Aqua dest. auf gleiches Volumen gebracht. Die Ansätze wurden dann mittels Papierelektrophorese¹ und einer chromatographischen Methode² auf ihre Zusammensetzung geprüft. Als Kontrollen liefen unbe-

lin noch das der Globuline untereinander merklich geändert wird. Hingegen verschiebt sich mit zunehmender Säuerung das Verhältnis der ausgefällten Globuline deutlich zugunsten der rascher wandernden Fraktionen (Abb. 3). Wurden Sedimente und Überstände wieder vereinigt, so ergaben sich 5 im Bereich der Fehlergrenze identische Kurven, die dem Originalserum entsprachen.

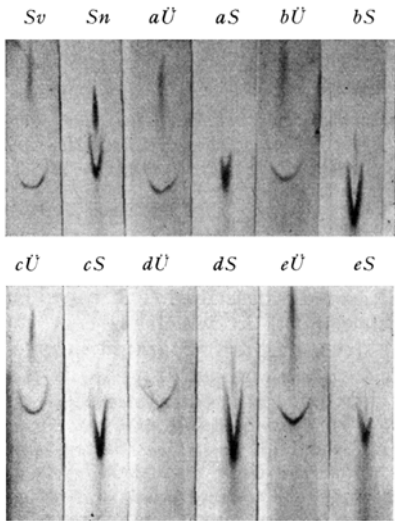


Abb. 1. Sv = Serum verdünnt, Sn = Normalserum, Chromatogramme a-e von Überstand (Ü) und Sediment (S) mit Säure gefällten Serums.

handeltes (o) und ein Serum, welches ebenso wie Probe (e) behandelt, aber nicht zentrifugiert wurde (v), mit. Ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld nach gehören die aus Nativserum gefällten Proteine allen Globulinunterfraktionen an. Nur im Zentrum des

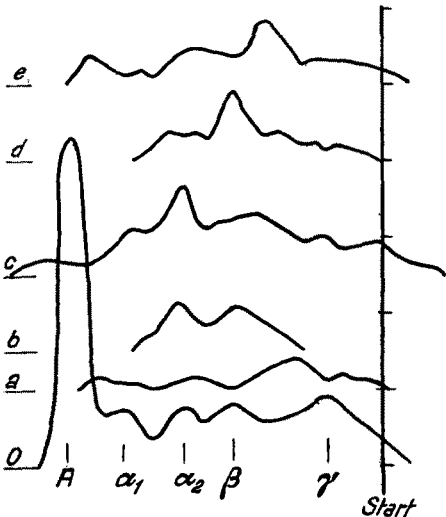


Abb. 2. Pherogramme von Normalserum und Sedimenten. a-e 8fach konzentriert.

Fällungsbereiches fällt eine Spur Albumin mit aus (Abb. 2). Das Quantum ist jedoch so gering, dass im Dissoziationsrest weder das Verhältnis Albumin:Globu-

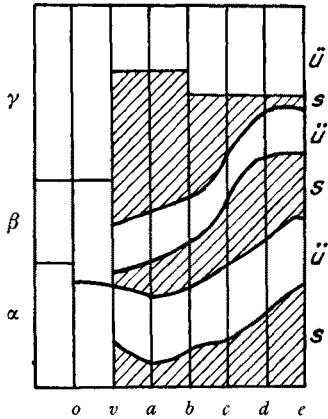


Abb. 3. Globuline als 1/200 des Gesamtglobulins.

lin Chromatogramm lässt sich deutlicher als in der Elektrophorese ein geringer Albuminanteil im Sediment feststellen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Globuline ist hier aber eher verringert.

Die nach Erhitzen erzielte Fällung lässt sich trotz ihrer Massigkeit in den ersten zwei Proben bei 5000 Touren nicht abzentrifugieren. In den zwei folgenden (c, d) ist die Flockung quantitativ, und erst bei der letzten (e) ist im Überstand Eiweiss nachzuweisen. Das gekochte Serum liess sich bei uns wie andernorts¹ weder elektro-

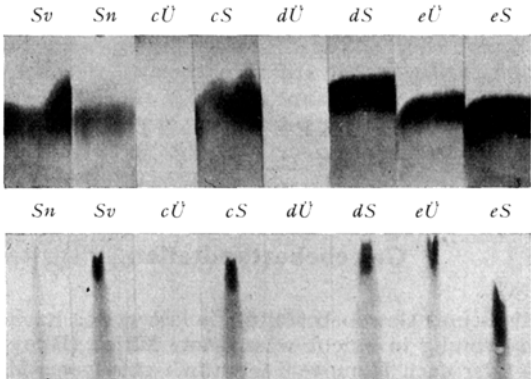


Abb. 4. Pherogramme und Chromatogramme hitzedenaturierten und säuregefallten Serums. Sv = Serum verdünnt gekocht, Sn = Serum koaguliert.

phoretisch noch chromatographisch fraktionieren. Wie die Originalpherogramme (Abb. 4) zeigen, reagiert dieses Produkt nach beiden Methoden wie ein rasch wanderndes Globulin.

Bei der durch Behandlung mit verdünnten Säuren ausfällbaren Fraktion handelt es sich also nicht, wie vermutet², um das Euglobulin der Salzfractionierung,

¹ W. GRASSMANN und K. HANNIG, Hoppe-Seyler's Z. 290, 1 (1952).

² K. SIMON, Med. Mschr. 8, 107 (1954).

¹ V. D. SCHEER, R. W. G. WYCKOFF und F. L. CLARKE, J. Immunol. 40, 39 (1941).

² W. SEITZ, Klin. Wschr. 25, 321 (1947).

sondern um kleine Anteile aller Globulinfractionen. Die Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass bei zunehmender Absorption von Kationen nur diejenigen Proteine im Sediment bleiben, denen anionische Gruppen verbleiben, die also nach Auflösung im alkalischen Barbituratpuffer am schnellsten zur Anode wandern. Das würde bedeuten, dass bei einem gegebenen pH nur ein Teil der Globuline mit Kationen abgesättigt wird, während ein anderer anionische Gruppen behält, sei es, dass diese im Innern des geknäuelten Moleküls liegen, sei es, dass jedes Proteinmolekül gleichviel Kationen absorbiert, ohne Rücksicht auf die Zahl seiner negativen Gruppen. Letztere Auffassung steht zunächst im Widerspruch zum Massenwirkungsgesetz.

Bei der Hitzedenaturierung wird elektrophoretisch wie chromatographisch ein Ladungsausgleich beobachtet. Daraus resultiert auch die einheitliche Fällbarkeit. Die Gesamtzahl der ionisierten Gruppen wird durch die Denaturierung nicht geändert, wie der unveränderte Säureverbrauch beweist¹.

K. Simon

Medizinische Universitäts-Poliklinik, München, den 4. Dezember 1953².

Summary

Diluted serum was treated with diluted acid. Between pH 6.8 and 6.5 a part of the globulines is precipitated whose composition changes in favour of the more rapidly migrating fractions with rising pH. Sera denaturated by heat are flocculated quantitatively and behave like one monodisperse protein also in electrophoresis and chromatography. This leads to the conclusion, other than after denaturation, that negative loads of native proteins possess different strengths of absorption toward H⁺.

¹ K. SIMON, Exper. 8, 55 (1952).

² Gegenwärtige Adresse: München-Solin, Whistlerweg 21.

PRO EXPERIMENTIS

Ein neuer Weg zur Gewinnung von Zellen- und Gewebestandteilen

Zellen- und Gewebestandteile lassen sich nach Gefriertrocknung in «nicht wässrigem» Milieu (BEHRENS, 1929) oder nach Homogenisieren in «wässrigem» Milieu (BENSLEY, 1934; DOUNCE, 1943) gewinnen. Bei beiden Methoden wird der ursprüngliche Zustand der histologischen Gebilde verändert. Der Wert der Trennungen wird dadurch wesentlich gemindert. Es wurde versucht, ein besseres Trennverfahren zu finden. Folgender Weg erwies sich als gangbar:

Die zu trennenden Gewebe werden in einem indifferenten Öl (Paraffinöl) emulgiert. Die histologischen Strukturen verteilen sich dabei, wie die mikroskopische Untersuchung zeigt, auf die verschiedenen Teilchen der dispersen Phase. Es gelingt nun, gleichartige Teilchen abzutrennen und damit bestimmte Zellen- und Gewebestandteile zu gewinnen. Die Trennung kann nach der Grösse durch dosiertes Zentrifugieren der Emulsion oder nach dem spezifischen Gewicht in geeigneten Tetrachlorkohlenstoff-Petroläther-Mischungen erfolgen. Der

Austausch des Öls durch diese Mischungen bietet keinerlei Schwierigkeiten. Bis jetzt wurden mit der neuen Methode Zellkerne aus Erythrozyten von Scyllium, aus dem Hepato-Pankreas des Octopus und der Leber der Maus isoliert.

Da die Zellkerne nur mit Paraffinöl, Tetrachlorkohlenstoff und Petroläther in Berührung gekommen sind, kann angenommen werden, dass sie nur geringfügige Veränderungen erfahren haben. Lediglich Fette und freie Lipide dürften teilweise extrahiert worden sein.

M. BEHRENS

Physiologisch-chemisches Institut der Medizinischen Akademie der Justus-Liebig-Hochschule, Giessen, und Zoologische Station, Neapel, 25. Oktober 1954.

Summary

A new method to obtain cells and tissue ingredients almost unaltered is described. The tissue is emulsified in an indifferent oil in which process the different histological structures are separated into the different droplets. Separating similar droplets, it is possible to gain single cells and tissue components.

PRO EXPERIMENTIS

A new Method for Measuring Membrane Potentials with External Electrodes

The true value of membrane potentials of biological core conductors can only be measured with external electrodes if the flow of injury current between a normal and an injured or depolarised part of membrane can be prevented by

- (i) compensating the potential drop which is at the origin of current flow¹, or
- (ii) increasing the longitudinal resistance of the outer medium.

Current flow in the core and in the outer medium in fact reduces the true value of the membrane potential measured with external electrodes by the short-circuiting factor

$$\frac{r_1}{r_1 + r_2}$$

where r_1 and r_2 are longitudinal resistances of the external and internal medium per unit length respectively.

An increase of r_1 to much higher values than r_2 will therefore tend to increase the short circuiting factor to unity. The potential measured with external electrodes will thus approximate the true membrane potential of the uninjured membrane. These conditions can be realised by the following procedure:

A bundle of myelinated nerve fibers of a frog is introduced into a hole of slightly greater diameter through which an isotonic sucrose solution of at least $2 \times 10^6 \Omega$ cm specific resistance flows at constant rate. The inflow of sucrose is made in the middle of the hole and the outflowing sucrose is spilled away by RINGER or test solutions flowing through vertical channels at both ends of

¹ A. F. HUXLEY and R. STÄMPFLI, J. Physiol. 112, 476 (1951).