

It is apparent from the findings presented here that colorimetric methods based on iodine adsorption cannot always be used for the quantitative determination of glycogen in liver. Certain difficulties encountered with the use of the iodine color method have already been pointed out by MORRIS¹. He found that temperature, salt concentration, and source of "standard" glycogen are critical factors, and stressed the point that standard samples of glycogen should be isolated from the same tissue as that under investigation. But, as shown in the present study, the colorimetric method is further limited by the fact that the physical characteristics of the glycogen responsible for the color intensity of the iodine-glycogen complex are extremely sensitive to the physiological state of the animal. Thus, valid measurements of tissue glycogen cannot be made by the iodine method when a rapid deposition of the polysaccharide has taken place.

Aided by a grant from Eli Lilly and Company.

Zusammenfassung

Es wird für die Bestimmung des Leberglykogens eine Jod-Adsorptionsmethode mit der üblichen Hydrolyse zu Glukose verglichen. Für normale und unbehandelte diabetische Ratten zeigen die Glykogenwerte mit beiden Methoden gute Übereinstimmung. Dagegen ist die Farbintensität je Gewichtseinheit des Jod-Glykogen-Komplexes bei insulinbehandelten diabetischen Ratten ebenso wie bei fastenden glukosegefütterten Ratten wesentlich grösser als bei normalen Tieren. Daraus lässt sich schliessen, dass frisch gebildetes Glykogen eine erhöhte Jod-Adsorptionsfähigkeit besitzt. Qualitativ erfährt die Farbe des Jod-Glykogen-Komplexes unter den verschiedenen Bedingungen keine Veränderung.

¹ D. L. MORRIS, J. Biol. Chem. 166, 199 (1946).

STUDIORUM PROGRESSUS

Die Dehnbarkeit des Skelett- und Herzmuskels der Schildkröte während der Latenzzeit

Von H. REICHEL und A. BLEICHERT¹, München

Die ersten Elastizitätsuntersuchungen am Muskel während der sogenannten Latenzzeit (das heisst der Zeit, die vom Augenblick des Reizes bis zum ersten eben nachweisbaren Anstieg der Spannung über die Ausgangsspannung verstreicht) sind von HILL² durchgeführt worden. Wenn der Muskel schnellen Dehnungen um etwa 10 % seiner Länge unterzogen wird, dann steigt noch während der Latenzzeit die Spannung des gereizten Muskels stärker an als die des ruhenden, nicht gereizten Muskels. Aus diesem Befund schliesst HILL, dass das kontraktile Material infolge des Reizes weniger dehnbar werde, und zwar schon zu einem Zeitpunkt, in dem die Verkürzung der kontraktilen Elemente nach aussen noch nicht manifest werde. BUCHTHAL und ROSENFALCK³ haben an Einzelfasern in isotonischer

Anordnung durch periodische Änderung der Last gleichfalls die Elastizität während der Latenzzeit untersucht und wie HILL eine Abnahme der Dehnbarkeit vor Beginn der Kontraktion gefunden. Auch die Messungen der Torsionselastizität durch STEN KNUDSEN¹ haben dasselbe Resultat ergeben, obwohl natürlich ein Rückschluss aus diesen Befunden auf das Verhalten der Längselastizität nicht ohne weiteres möglich erscheint.

Nach unseren eigenen experimentellen Erfahrungen kommt es bei den Untersuchungen der Dehnbarkeit auf den mechanischen Ausgangszustand an, in dem sich der Muskel vor dem Versuch befindet. In der Arbeit von BUCHTHAL und ROSENFALCK² fehlen darüber nähere Angaben. Die Befunde von HILL sind an Muskeln erhoben worden, deren Ausgangslänge wesentlich kleiner als ihre Ausgangslänge *in situ* ist. Unter diesen Bedingungen rufen aufeinanderfolgende Dehnungen auch am ruhenden Muskel verschiedene steile Spannungsanstiege hervor. Im nicht vorgedehnten Zustand hat der Muskel plastische Eigenschaften; seine Strukturen werden daher bei starken Dehnungen nicht nur elastisch beansprucht, sondern auch in ihrem Gefüge und in ihrer Anordnung geändert (REICHEL³). Solche plastischen Nebeneffekte erschweren eine eindeutige Aussage über das elastische Verhalten des Muskels erheblich. Bei der grundsätzlichen Bedeutung der Hillschen Befunde (s. WEBER und PORTZEHL⁴) halten wir es für notwendig, die Elastizitätsuntersuchungen während der Latenzzeit mit einer Methode zu wiederholen, die plastische Nebeneffekte ausschliesst.

Methodik. Wir haben uns einer früher beschriebenen Methode (PIEPER, REICHEL und WETTERER⁵) bedient, mit der dem Muskel nach dem zum ersten Mal von BUCHTHAL und KAISER⁶ angegebenen Prinzip sinusförmige Längenänderungen hoher Frequenz aufgezungen werden. Die resultierenden Spannungsamplituden sind dann ein Mass für die Steifheit des Muskels oder für den reziproken Wert seiner Dehnbarkeit. Die benutzten Längenänderungen sind relativ klein (1–4 % der sogenannten «Standardlänge», die der Muskel *in situ* einnimmt, s. HILL⁷). Als Ausgangsspannung wird in den meisten Fällen eine Spannung gewählt, die weniger als 1 % der isometrischen Gesamtspannung im Gipfel der Einzelzuckung beträgt. Der Spannungsbereich, in dem die durch die Längenänderungen hervorgerufenen Spannungsamplituden sich bewegen, ist daher sehr klein; das Minimum der Spannungsamplituden liegt gewöhnlich bei Null. Dadurch wird die Möglichkeit ausgeschlossen, dass nicht nur die kontraktilen Ketten, sondern auch etwaige parallel zu ihnen liegende Strukturen elastisch mitbeansprucht werden (über die Frage des sogenannten parallel elastischen Elements siehe im übrigen REICHEL⁸). Die Wahl einer niedrigen Ausgangsspannung bei kleinen Längenänderungen bietet ausserdem den Vorteil, dass die plastischen Nebeneffekte unbedeutend sind. Einzelne Versuche sind auch bei höheren Ausgangsspannungen durchgeführt worden. Soweit in diesen Versuchen plastische Effekte vorhanden sind, werden sie einige Zeit nach Ein-

¹ O. STEN KNUDSEN, Acta physiol. scand. 28, Suppl. 104 (1953).

² F. BUCHTHAL and P. ROSENFALCK, Abstr. Communic. XIX. Internat. Physiol. Congr. Montreal 1953, 244.

³ H. REICHEL, Erg. Physiol. 47, 469 (1953).

⁴ H. H. WEBER und H. PORTZEHL, Erg. Physiol. 47, 369 (1953).

⁵ H. PIEPER, H. REICHEL und F. WETTERER, Z. Biol. 104, 469 (1951).

⁶ F. BUCHTHAL und E. KAISER, Acta physiol. scand. (Stockholm) 8, 38 (1944).

⁷ A.V. HILL, Proc. roy. Soc. [B] 137, 320 (1950); 138, 339 (1951).

⁸ H. REICHEL, Erg. Physiol. 47, 469 (1953).

¹ Aus dem Physiologischen Institut der Universität München.

² A.V. HILL, Proc. roy. Soc. [B] 137, 320 (1950); 138, 339 (1951); 138, 329 (1951).

³ F. BUCHTHAL und P. ROSENFALCK, Abstr. Communic. XIX Internat. Physiol. Congr. Montreal 1953, 244.

schalten des Motors, der die sinusförmigen Längenänderungen erzeugt, an einem langsamen Abfall der Spannungsamplituden erkannt. Innerhalb einiger Minuten stellen sich aber die Amplituden der Spannungsänderungen regelmässig auf einen konstanten Endwert ein.

Als Versuchsobjekte werden der *M. scapuloantibrachii* und der Herzstreifen der Schildkröte (*testudo Graeca*) benutzt, die vor anderen Präparaten den Vorteil einer langen Kontraktionsdauer und einer entsprechenden langen Latenzzeit haben. Durch Abkühlung auf $0-5^{\circ}\text{C}$ wird die Latenzzeit zusätzlich so verlängert (bis auf 100 ms beim Skelettmuskel und bis auf 500 ms beim Herzmuskel), dass bei genügend hoher Frequenz der sinusförmigen Längenänderungen (20–80 Hz) wenigstens 3 Spannungsamplituden in die Zeitspanne zwischen Reiz und Beginn der isometrischen Kontraktionskurve fallen. Die Objekte werden in von Sauerstoff durchperilter, gepufferter Lösung nach BARKAN, BROEMSER und HAHN¹ mit Glukosezusatz gehalten. Unter diesen Bedingungen bleiben die Muskeln über Stunden voll funktionsfähig.

Die Einspannung der Objekte ist dieselbe wie in früheren Arbeiten. Der Skelettmuskel wird mit Seidenfaden zwischen Längen- und Spannungshebel kurz angebunden. Die Dehnbarkeit des Seidenfadens geht zwar in die Messungen als Fehler ein, ist aber relativ zu der des Muskels sehr gering und spielt für die Vergleichsmessungen keine Rolle. Der Herzstreifen wird als Ring aus dem Ventrikel der Schildkröte ausgeschnitten; durch den Ring werden zwei Leukoritröllchen geschoben, von denen das eine unmittelbar am Längenhebel befestigt, das andere mit Drahtbügel am Spannungshebel eingehängt wird.

Als Reizelektroden werden Silberblechstreifen benutzt, die den Objekten über die ganze Länge anliegen. Dadurch wird eine gleichzeitige Erregung der ganzen Muskellänge gewährleistet. Bei den Skelettmuskelversuchen liegt das Objekt zwischen zwei Silberblechstreifen, von denen der eine als Kathode, der andere als Anode geschaltet ist. Bei den Herzmuskelversuchen sind beide Blechstreifen Kathoden, während als Anoden zwei Silberdrähte dienen, die in den beiden Leukoritröllchen eingelassen sind. Der Reiz besteht in einer Kondensatorenladung (Spitzenpotential 5 V). Die Reizauslösung erfolgt automatisch nach Öffnung des Kymoverschlusses bei einer bestimmten Stellung der Kymographiontrommel.

Bei jedem Einzelversuch wird eine isometrische Kontraktion mit und ohne aufgesetzte Spannungsänderungen auf ein und denselben Filmstreifen registriert. Als Beginn der Latenzzeit wird der Reizeinbruch, als ihr Ende der erste eben messbare Anstieg der isometrischen Kontraktionskurve ohne aufgesetzte Spannungsänderungen markiert. Zur Bestimmung dieses Zeitpunktes wird eine Glasplatte mit eingraviertem Millimeternetz an die gleichzeitig registrierte Nulllinie angelegt. Auf dieselbe Weise werden Spannungsamplituden vor, während und nach der Latenzzeit ausgemessen. Der Fehler der Latenzzeitbestimmung ist im Durchschnitt nicht grösser als $\pm 5\%$; die maximale Fehlerbreite der Spannungsmessung beträgt 5%. Die zur Spannungsmessung verwandten Blattfedern haben Eigenschwingungszahlen von 500 bis 900 Hz, die Empfindlichkeit ist 3,5 cm Ausschlag für 10 g. Bei dieser Empfindlichkeit lässt die Anordnung eine geringe Verkürzung des Muskels um maximal 0,25% seiner Gesamtlänge zu; insofern sind also die Bedingungen nicht rein isometrisch.

Während eines jeden Einzelversuches ist auf strenge Temperaturkonstanz der Badeflüssigkeit geachtet worden. Im ganzen sind 5 Versuche am Skelettmuskel mit etwa 60 auswertbaren Einzelaufnahmen und 3 Versuche am Herzmuskel mit etwa 40 auswertbaren Einzelaufnahmen durchgeführt worden.

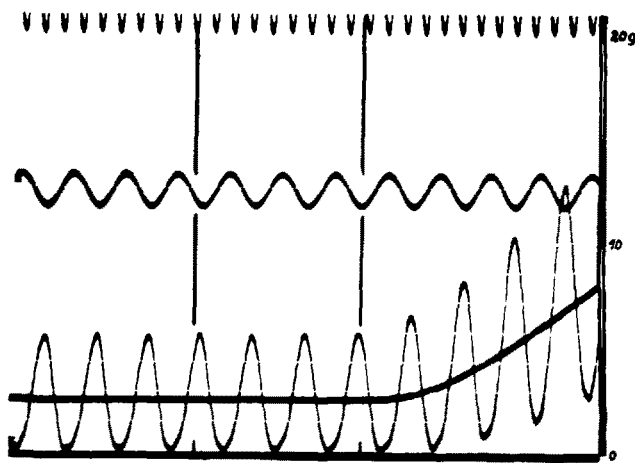


Abb. 1. Originalkurve, Skelettmuskel der Schildkröte. Von oben nach unten: 1 Zeitmarke (1/100 s), 2 Länge ($\Delta l = 0,209 \text{ mm} = 0,7\% l_0$), 3 Spannung mit aufgezwungener Längenänderung, 4 Spannung ohne Längenänderung, 5 Nulllinie. Die Latenzzeit ist durch die beiden senkrechten Striche angegeben. Dehnungsfrequenz 37 Hz, $l_0 = 30 \text{ mm}$, Latenzzeit = 87,7 ms, Temperatur $0,2^{\circ}\text{C}$.

Ergebnisse. Abbildung 1 zeigt eine typische Aufnahme, die am Skelettmuskel gewonnen worden ist. Einzelheiten sind aus der Legende zu ersehen. Die Spannungsamplituden bleiben durch die ganze Latenzzeit dieselben. Auch am zeitlichen Ablauf der Spannungsänderungen sind keine Unterschiede zu erkennen. Im Augenblick, in dem die Kontraktionskurve sich über ihr Ausgangsniveau erhebt, steigen auch die Spannungsamplituden steil an.

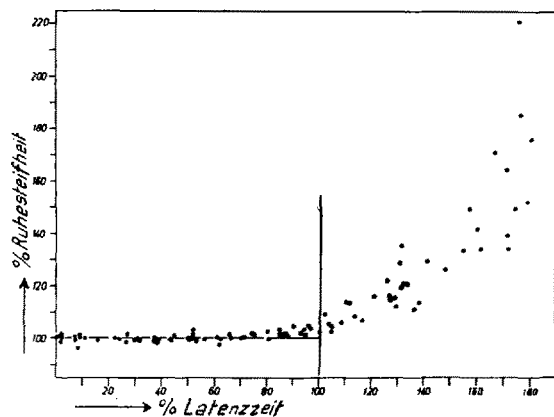


Abb. 2. Auswertung eines Versuches am Skelettmuskel. Ausgangsspannung im Dehnungsminimum = 0–4,6 g, Dehnungsfrequenz 9–53 Hz, Längenänderung 0,209–0,604 mm = 0,7–2,01% l_0 , Standardlänge $l_0 = 30 \text{ mm}$, Temperatur = $0,5-2,5^{\circ}\text{C}$. Latenzzeit 62–130 ms.

Abbildung 2 zeigt das Ergebnis der Aufnahmen eines ganzen Versuches bei verschiedener Temperatur, Ausgangsspannung und Frequenz der Längenänderungen. Aus dieser Abbildung geht hervor, dass auch unter den verschiedensten Bedingungen die Steifheitswerte (als Prozent der Spannungsamplitude in ruhendem Zustand

¹ G. BARKAN, PH. BROEMSER und A. HAHN, Z. Biol. 74, 1 (1922).

angegeben) erst nach Abklingen der Latenzzeit sich deutlich über die 100-Prozent-Marke erheben. Einige Punkte liegen bereits vor Beginn der Kontraktion über dem Ruhewert. Die Abweichungen sind aber so gering (maximal 6%), dass sie nicht als Änderungen der Dehnbarkeit gewertet werden können.

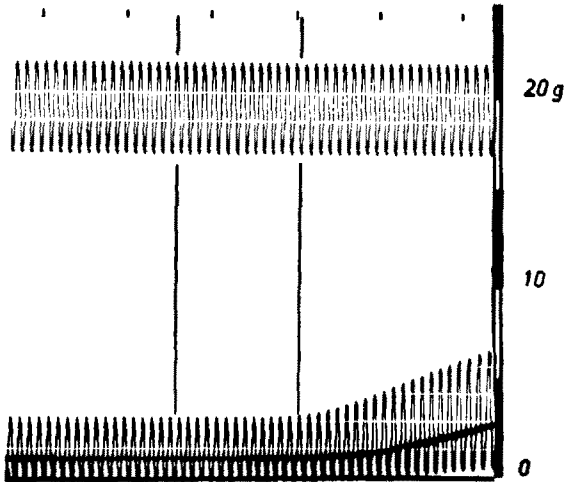


Abb. 3. Originalkurve. Herzmuskel der Schildkröte. Reihenfolge der Kurven wie in Abbildung 1. Längenänderung $\Delta l = 0,604 \text{ mm} = 2,1\% l_0$, Ausgangslänge des Ringes bei der Spannung $0 l_0 = 22 \text{ mm}$, Dehnungsfrequenz $= 44,7 \text{ Hz}$, Temperatur $5,8^\circ \text{C}$, Latenzzeit 295 ms , Zeitmarke: $\frac{1}{16} \text{ s}$.

Abbildung 3 zeigt das entsprechende Verhalten des Herzmuskels. Auch hier bleibt das Band der Spannungsamplituden über die Dauer der Latenzzeit unverändert. Eine Auswertung der Aufnahme wie in Abbildung 2 ergibt denselben Kurvenverlauf.

Diskussion. Die Befunde zeigen eindeutig, dass sich die dynamische Dehnbarkeit während der Latenzzeit nicht ändert. Unsere Ergebnisse widersprechen zunächst den von HILL¹ mit seiner «Quick stretch»-Methode erhobenen Befunden. Der Widerspruch erklärt sich aber zwanglos aus den verschiedenen Versuchsbedingungen. Wie in der Einleitung bereits erörtert wurde, schliesst die von HILL¹ angewandte Technik und die besondere Vorbehandlung des Muskels (isotonische Vorverkürzung auf Längen, die weit unter der Standardlänge liegen) nicht das Auftreten plastischer Effekte aus, die den Verlauf der Spannungskurve bei einer plötzlichen Dehnung entscheidend beeinflussen können. Dafür spricht auch der zur Zeitabszisse konkav gekrümmte Verlauf der Hillschen Spannungskurven bei annähernd linearer Geschwindigkeit der Dehnung. Bei einer Dehnung, die nur die elastischen Strukturen ohne plastische Nebeneffekte beanspruchen würde, wäre eine Spannungskurve zu erwarten, die wie üblich nach der Längen- oder hier nach der Zeitabszisse konvex verläuft.

HILL¹ nimmt an, dass die Elastizität des ruhenden Muskels vorwiegend oder ausschliesslich von parallel elastischen Strukturen getragen werde (siehe hierzu REICHEL²); deswegen sei die Elastizität des erregten

Muskels während der Latenzzeit nur dann zu erfassen, wenn die parallel elastischen Elemente nicht ins Spiel kommen, also nur bei Längen, die unterhalb der Standardlänge liegen. Wir haben aus diesem Grunde in vielen Versuchen Spannungen angewendet, die nur wenig oder gar nicht von Null abwichen. Wir haben ferner in der Mehrzahl der Versuche die Längenänderungen so klein gewählt, dass die Maxima der Spannungsamplituden nur wenige Prozent der isometrischen Gesamtspannung ausmachen. In diesem Spannungsbereich ist ein nennenswerter Anteil der parallel elastischen Elemente auch nach den Angaben von HILL unwahrscheinlich. Bei höheren Spannungen wäre unter der Annahme der Richtigkeit der Hillschen Anschauungen¹ eine Addition der Spannung des parallel elastischen und des in der Latenzzeit bereits beanspruchten Serienelementes zu erwarten. Das hätte zwangsläufig eine Überhöhung der Spannungsamplitude über den Ruhewert in unseren Versuchen zur Folge.

Nach HILL² soll das kontraktile Material sich in Ruhe in einem nahezu plastischen Zustand befinden, während die elastischen Serienelemente schlaff und elastisch kaum beansprucht seien. Die isometrische Kontraktion könne daher erst dann nach aussen manifest werden, wenn die kontraktilen Elemente die elastischen Serienelemente so weit vorgedehnt haben, dass sie in der Lage sind, messbare elastische Kräfte zu entwickeln. Die Wirkung einer starken Dehnung während der Latenzzeit bestehe nun gerade darin, dass sie die elastischen Elemente vorzeitig dehne und daher noch vor Beginn der normalen isometrischen Kontraktionskurve zu einem Anstieg der Spannung über den Ruhewert führe. Man könnte daher gegen unsere Versuche einwenden, dass die von uns benutzten Längenänderungen zu klein sind um den von HILL² angenommenen Effekt sichtbar zu machen. Eine einfache Überschlagsrechnung zeigt aber, dass dies nicht der Fall ist: die maximale isotonische Verkürzungsgeschwindigkeit des Froschskelettmuskels (*M. sartorius*) beträgt nach HILL¹ $2,0 l_0/\text{s}$ ($l_0 = \text{Standardlänge}$). Der Schildkrötenmuskel ist etwa achtmal langsamer als der Sartorius des Frosches. Das ergibt für einen Muskel von 30 mm Standardlänge eine maximale Geschwindigkeit der Verkürzung von $7,5 \text{ mm/s}$. Unter der extremen Annahme, dass die kontraktilen Elemente bereits im Beginn der Latenzzeit sich mit dieser Maximalgeschwindigkeit verkürzen, würde nach einer Latenzzeit von etwa 90 ms die Verkürzung des kontraktilen Elementes bzw. die Dehnung des Serienelementes $0,68 \text{ mm}$ betragen. Die von uns benutzten Längenänderungen betragen bis zu $1,15 \text{ mm}$; sie müssten also ausreichen, einen nach aussen sichtbaren Spannungsanstieg über den Ruhewert während der Latenzzeit hervorzurufen. Eine analoge Berechnung für den Herzmuskel führt zu demselben Ergebnis.

Summary

By means of a method permitting the continuous measurement of the dynamic stiffness of elastic structures, it was shown on the skeletal and heart muscle of the tortoise that during the latent period the elasticity remains unchanged in relation to the resting value.

¹ A. V. HILL, Proc. roy. Soc. [B] 137, 320 (1950); 138, 339 (1951).

² H. REICHEL, Erg. Physiol. 47, 469 (1953).

¹ A. V. HILL, Proc. roy. Soc. [B] 138, 339 (1951).

² A. V. HILL, Proc. roy. Soc. [B] 137, 320 (1950); 138, 339 (1951).