

glycogen in cells, the smears were submitted to the P.A.S. reaction, according to HORCHKISS. To evaluate the average glycogen content per cell, the average reaction index (A.R.I.) according to ASTALDI *et al.*<sup>6</sup> was determined separately for neutrophils and lymphocytes.

The results obtained from neutrophils are given in Table I, those regarding lymphocytes in Table II. The Figure expresses graphically the quantitative behaviour of the glycogen content of the irradiated leucocytes in relation to the control taken as 100.

The differences between the control and the irradiated leucocytes were submitted to statistical analysis, using Student-Fisher t test. The differences resulted in a significant degree, applying the t value to the differences in pairs.

From the results taken as a whole, we may conclude that X-rays carried out directly on surviving leucocytes cause an evident increase of glycogenolysis in these cells. Such a phenomenon occurs to a still more marked degree in lymphocytes than in neutrophils.

G. ASTALDI and L. VERGA

Department of International Medicine, University of Pavia, and The Blood Research Foundation Center, Hospital of Tortona (Italy), December 27, 1956.

#### Riassunto

Sono stati irradiati direttamente *in vitro* leucociti sopravviventi ed è stato studiato il loro contenuto in glicogeno durante la sopravvivenza.

I risultati dimostrano un aumento significativo della glicogenolisi nei leucociti irradiati rispetto ai controlli. Riguardo alla perdita del loro contenuto in glicogeno, i linfociti risultano più sensibili dei neutrofili alla irradiazione Roentgen.

<sup>6</sup> G. ASTALDI, E. BERNARDELLI, and E. G. RONDANELLI, Haematology 36, 749 (1952).

#### The Influence of Lowering the Body Temperature on Postural Orientation of the Organism

It is well known that the postural orientation of the organism as a whole and of separate parts of the body is realized by the righting reflexes of Magnus, the centres of which are localized in the reticular formation of the brain-stem at the level of the nucleus ruber. Stereotaxic lesions are a common cause of elimination of these reflexes. This causes irreversible damage, which usually affects simultaneously the centres of several reflexes. It is possible to obtain a successive, and at the same time a relatively quick, functional elimination of these reflex centres, which is reversible, and which was obtained in our experiments by a lowering of the body temperature.

A considerable drop of temperature of the environment was used for lowering the animal body temperature (30 rabbits). The loss of a prompt and exact body righting response was denoted as the stage of a decreased response. As can be seen from the Table, lowering of the body temperature first leads to the extinction of Magnus' body righting reflexes acting on body, while the labyrinthine righting reflexes are the last to be lost. The recovery of reflexes takes place in the reverse order, i.e. first to appear, are the labyrinthine reflexes. The order

The order in which the postural reflexes are eliminated after lowering the body temperature

Rectal temperature °C	Percentage of animals, in which a postural reflex response was seen					
	I		II		III	
	a	b	a	b	a	b
25–24	30					
23–22	70	20	30	10	10	
21–20	20	80	60	40	30	20
19–18		100	10	90	40	50
17–16				100	20	80
15–14						100

I Body righting reflexes acting on body (Magnus)

II Neck righting reflexes

III Labyrinth righting reflexes

a Decreased reflex response, b Extinction of reflexes.

in which the elimination of reflexes progresses is quite constant and also stresses the importance of the labyrinths for spatial analysis, which makes possible the general postural orientation of the organism.

D. SVORAD

Institute of Physiology, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, December 20, 1956.

#### Zusammenfassung

Durch starke Unterkühlung des Warmblüterorganismus kann man die Stellreflexe sukzessiv und reversibel ausschalten. Zuerst erlöschen die Magnusschen Körper-Stellreflexe und zuletzt die labyrinthären Stellreflexe.

#### Versuche zur biologischen Bestimmung der Sedimentationskonstanten kleiner neurotroper Viren in der präparativen Ultrazentrifuge «ZF 3»

BEYERLE, MOHRING und BÜCHER<sup>1</sup> berichteten 1954 über eine neue, elektromagnetisch angetriebene Präparatorenzentrifuge (Typenbezeichnung «ZF 3»), deren besondere Eigenart darin besteht, dass das gesamte Einsatzvolumen in einer einzigen, radial zur Drehachse gerichteten Zelle zusammengefasst ist. Ein Gerät dieser Bauart wurde in unserem Laboratorium erstmalig für virologische Studien eingesetzt und hat sich seit längerer Zeit beim präparativen Arbeiten mit kleinen neurotrophen Viren bewährt. Die dabei gesammelten Erfahrungen veranlassten uns zu prüfen, ob die Zentrifuge auch zur Bestimmung von Sedimentationskonstanten auf biologischem Wege, das heißt aus der Aktivitätsabnahme im Überstand der Zelle, herangezogen werden kann. Als Modell für unsere Untersuchungen wählten wir das Encephalomyocarditis-(EMC-)Virus der Maus, dessen Sedimentationskonstante von WEIL *et al.*<sup>2</sup> mittels

<sup>1</sup> K. BEYERLE, D. MOHRING und TH. BÜCHER, Chem. Ing. Technik 26, 94 (1954).

<sup>2</sup> M. L. WEIL, J. WARREN, S. S. BRESEE, S. B. RUSS und H. JEFFRIES, J. Bacteriol. 63, 99 (1952).

der Lichtabsorptionsmethode zu 148 bis 159 S bestimmt wurde.

**Material und Methoden.** Aufbau und Arbeitsweise der Zentrifuge wurden bereits ausführlich von BEYERLE *et al.*<sup>1</sup> beschrieben. Zum besseren Verständnis des folgenden sei lediglich auf die Radialzelle (Abb. 1) noch einmal kurz eingegangen. Sie besteht aus einem mechanisch und chemisch besonders widerstandsfähigen Stahl, verfügt über ein Fassungsvermögen von etwa 6 cm<sup>3</sup> und gestattet bei annähernd doppelter Werkstoffsicherheit Drehzahlen bis zu 84 000 U./min (= 500 000 g am Zellenboden). In den zylindrischen Präparatraum können verschiedene, aus Plexiglas angefertigte Sedimentfallen eingesetzt werden, die zum Erfassen des Sediments sowie als Schutz gegen Strömungen und Diffusion beim Abbremsen der Zentrifuge dienen. Besonders bewährt hat sich ein auch für die folgenden Versuche benutzter Fallentyp, bei dem der Falleninhalt (0,04 cm<sup>3</sup>) durch einen Düsentrichter von dem übrigen Zellvolumen abgetrennt ist.

Als Untersuchungsmaterial verwendeten wir 1%ige Homogenate infektiöser Mäusegehirne in m/15 Phosphatpuffer pH 7,4. Gröbere Zelltrümmer wurden durch 20 min langes Zentrifugieren bei 15 000 U./min abgeschleudert. Die Zentrifugationen in der ZF 3 erfolgten zu gestaffelten Versuchszeiten bei 56 000 U./min ( $\pm 200$ ). Die Anlaufzeiten bis zum Erreichen der vollen Drehzahl betrugen etwa 85, die Bremszeiten zwischen 200 und 250 s. Durch Kühlung der Läuferkammer mit zirkulierender Kältesole ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) und ständiges Spülen mit Wasserstoffgas (10 Torr) konnte die Temperatur der entsprechend vorgekühlten Zelle von Beginn bis Ende eines Laufes auf  $6^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,2$ ) begrenzt werden.

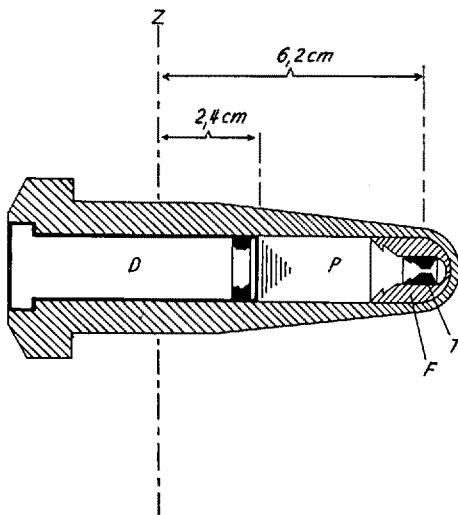


Abb. 1. Radialzelle der Präparierzentrifuge ZF 3. Z = Drehachse, P = Präparatraum, D = vakuumdichter Verschlusskörper, F = Sedimentfalle mit Düsentrichter (T).

Nach der Zentrifugation wurde jeweils der gesamte Überstand oberhalb des Düsentrichters abpipettiert, durchmischt und auf seine Infektiosität ( $\text{LD}_{50}$  nach REED und MUENCH<sup>3</sup>) hin geprüft. Die Titrationen erfolgten durch Verimpfen von 10fachen Verdünnungsreihen auf etwa 14 g schwere weisse Mäuse. Pro Verdünnungsstufe wurden jeweils 6 Tiere subkutan mit je 0,2 ml infiziert. Die Titerdifferenzen zwischen dem Ausgangsmaterial und den Überständen liefern einen Massstab für die während der Zentrifugation stattgefundenen

Konzentrationsabnahmen, aus denen die Sedimentationskonstante des Virus errechnet werden soll.

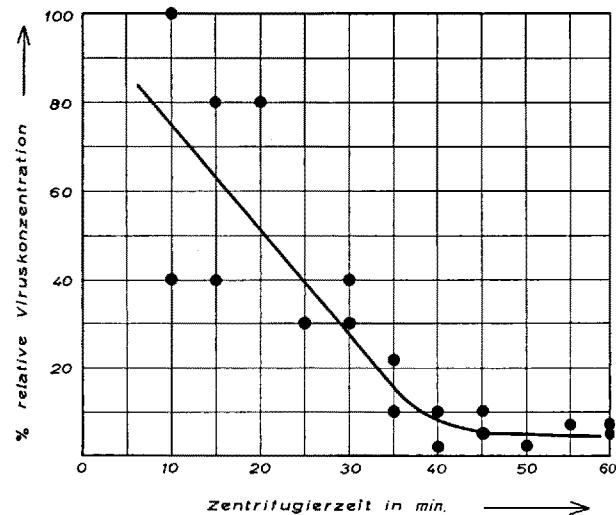


Abb. 2. Aktivitätsabnahme im Zellenüberstand (56 000 U./min,  $6^{\circ}\text{C}$ ).

**Ergebnisse.** In Abbildung 2 haben wir die relativen Viruskonzentrationen der Überstände (bezogen auf das Ausgangsmaterial = 100%) gegen die Versuchszeiten aufgetragen. Die aus den einzelnen Punkten konstruierte Kurve veranschaulicht den Sedimentationsvorgang. Im einzelnen zeigt sie, dass bis zu einer Zentrifugierdauer von etwa 40 min eine im Durchschnitt gesehen kontinuierliche Konzentrationsabnahme stattfindet. Im weiteren Verlauf flacht die Kurve ziemlich plötzlich ab und geht in einen fast parallel zur Abszisse auslaufenden Abschnitt über. Es verbleiben also im Überstand gewisse Restaktivitäten, die zwischen 1-10% der Ausgangsinfektiosität betragen. In einem ergänzenden Versuch wurde der nach 60 min langer Zentrifugierdauer immer noch infektiöse Überstand ein zweites Mal über 40 min zentrifugiert. Hierbei zeigte sich erneut eine Konzentrationsabnahme von mehr als 90%. Die Restaktivitäten werden demnach nicht durch kleinere Einheiten des infektiösen Prinzips hervorgerufen, sondern müssen auf methodisch bedingte Faktoren zurückgeführt werden.

Für das Berechnen der Sedimentationskonstante haben wir die von SVEDBERG und PEDERSEN<sup>4</sup> für sektorförmige Separationszellen abgeleitete Gleichung auf die zylindrische Gestalt unserer Zelle umgeformt. Die Gleichung lautet dann

$$S = -\frac{1}{\omega^2 \cdot t} \cdot \ln \left[ \frac{x_0}{x_i} + \frac{C_t \cdot (x_i - x_0)}{C_0 \cdot x_i} \right]$$

( $\omega$  = Winkelgeschwindigkeit,  $t$  = Zentrifugierdauer,  $x_0$  = Abstand zwischen Drehzentrum und Meniscus,  $x_i$  = Abstand zwischen Drehzentrum und Zellenboden, wobei wir als Zellenboden die Mitte des Düsentrichters gewählt haben,  $C_0$  = Konzentration (Aktivität) im Ausgangsmaterial,  $C_t$  = Konzentration im Überstand nach der Zentrifugation.)

Die Formel berücksichtigt die Inhomogenität des Schwerkiefeldes, die in der ZF 3 besonders gross ist, da hier die effektive Zelllänge ungewöhnlich lang, die Abstände des Meniskus und Zellenbodens vom Drehzen-

<sup>3</sup> L. J. REED und H. MUENCH, Amer. J. Hyg. 27, 493 (1938).

<sup>4</sup> T. SVEDBERG und K. O. PEDERSEN, *Die Ultrazentrifuge* (Verlag Steinkopf, Leipzig und Dresden 1940).

trum dagegen nur kurz sind. Anlauf- und Bremszeiten wurden wegen ihrer Kürze im Verhältnis zur Zentrifugierdauer bei voller Drehzahl nicht berücksichtigt. Die möglichen Fehlerquellen, die dadurch zu erwarten sind, dass die Zellform nicht der radialen Wanderungsrichtung der sedimentierenden Teilchen angepasst ist, seien zunächst einmal vernachlässigt.

Aktivitätsabnahmen und daraus errechnete Sedimentationskonstanten des EMC-Virus bei Zentrifugierversuchen in der ZF3 (56000 U./min, 6°C)

Zentrifugierzeit in s	Versuch Nr.	-log LD <sub>50</sub>		log Titerdifferenz	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	S <sub>20</sub>
		V	N			
600	1	7,3	7,5	—	—	—
600	2	7,7	7,3	0,4	0,4	349
900	3	7,3	7,2	0,1	0,8	71
900	4	7,7	7,3	0,4	0,4	232
1200	5	7,3	7,2	0,1	0,8	53
1500	6	7,5	7,0	0,5	0,3	169
1800	7	7,7	7,3	0,4	0,4	118
1800	8	7,5	7,0	0,5	0,3	141
2100	9	7,7	7,0	0,7	0,2	137
2100	10	7,3	6,3	1,0	0,1	175
2400	11	7,5	6,5	1,0	0,1	153
2400	12	7,7	6,0	1,7	0,02	175
2700	13	7,5	6,5	1,0	0,1	137
2700	14	7,3	6,0	1,3	0,08	145
3000	15	7,7	6,2	1,5	0,03	137
3300	16	7,3	6,2	1,1	0,08	116
3600	17	7,3	6,0	1,3	0,05	108
3600	18	7,3	6,2	1,1	0,08	106
Mittelwert aus den Versuchen 6 bis 14					150	

V = im Ausgangsmaterial vor der Zentrifugation

N = im Überstand nach der Zentrifugation

In der Tabelle sind die Daten aller Einzelversuche und die daraus errechneten Sedimentationskonstanten (in Svedbergeinheiten, bezogen auf Wasser als Lösungsmittel bei 20°C) zusammengestellt. Legt man den von WEIL *et al.*<sup>2</sup> auf optischem Wege gefundenen Mittelwert von 154 S als Maßstab für die Genauigkeit unserer Ergebnisse zugrunde, so zeigt sich, dass die Versuche mit einer Zentrifugierdauer von 25 bis 50 min, das heisst Versuche im Bereich einer durchschnittlichen Aktivitätsabnahme von etwa 70 bis gerade 90%, die besten Resultate liefern. Die Einzelwerte stimmen befriedigend, der Mittelwert sogar überraschend gut mit der optisch bestimmten Sedimentationskonstante überein. Beim Zentrifugieren über jenen Zeitpunkt hinaus, zu dem eine durchschnittliche Konzentrationsverminderung um 90% erreicht ist, werden die errechneten S-Werte zunehmend kleiner. Versuchszeiten im Bereich einer durchschnittlichen Aktivitätsabnahme von weniger als 70% ergeben übermäßig streuende Sedimentationskonstanten.

**Diskussion.** 1. Die Zentrifuge ZF 3 kann, obgleich die Seitenwände der Zelle und die Aussenteile der Sedimentfalle nicht der radialen Bewegungsrichtung der Partikel angepasst sind und das herrschende Schwerefeld recht inhomogen ist, zur biologischen Bestimmung der Sedimentationskonstanten tierpathogener Viren herangezogen werden. Voraussetzung ist, dass der Sedimentationsvorgang analysiert wird und nur solche Einzelversuche ausgewertet werden, die hinsichtlich der

Zentrifugierdauer im Bereich einer durchschnittlichen Aktivitätsabnahme von etwa 70 bis gerade 90% liegen.

2. Versuche mit kürzeren Laufzeiten führen zu einer selbst für biologische Methoden kaum mehr vertretbaren Streuung der errechneten Sedimentationskonstante. Die Ursache hierfür ist vornehmlich darin zu suchen, dass sich die begrenzte Güte des biologischen Tests bei geringen Aktivitätsabnahmen, das heisst bei kleinen C<sub>t</sub>/C<sub>0</sub>-Werten, zunehmend nachteilig auswirkt. Aus dem gleichen Grunde streuen auch die nach kurzen Laufzeiten erhaltenen Punkte in Abbildung 2 besonders stark.

3. Zentrifugiert man andererseits über den Zeitpunkt der erreichten 90prozentigen Aktivitätsabnahme hinaus, so errechnen sich zu kleine S-Werte. Es ist dies darauf zurückzuführen, dass der Sedimentationsvorgang bei einer Konzentrationsverminderung um etwa 90% bis auf das Verbleiben gewisser Restaktivitäten nahezu beendet ist und ein überschüssiges Zentrifugieren somit nicht mehr dem theoretischen Anwendungsbereich der oben genannten Gleichung entspricht.

4. Konvektionsströmungen, die infolge der zylindrischen Zellform und der Sedimentfalle zu erwarten sind, können nur so geringfügig sein, dass hierdurch die ohnehin begrenzte Exaktheit biologischer S<sub>20</sub>-Bestimmungen nicht beeinträchtigt wird. Die Restaktivitäten sind nicht oder zumindest nicht ausschliesslich auf die Gestalt der Zelle zurückzuführen. Das gleiche Phänomen findet sich auch beim Arbeiten mit sektorförmigen Zellen (EPSTEIN und LAUFFER<sup>5</sup>, DREES<sup>6</sup>).

5. Es muss dahingestellt bleiben, wie sich die Viruspartikel, die sich ausserhalb des der radialen Wanderungsrichtung entsprechenden Zellvolumens befinden, während der Sedimentation verhalten. Da die Menge etwa 1/4 des gesamten Einsatzvolumens ausmacht, könnte durch sie das Ergebnis nur dann merklich beeinträchtigt werden, wenn dieses Virus nach Erreichen der Zellwand dort haften bleibt und beim Abpipettieren annähernd quantitativ wieder in den Überstand eingeht. Das aber ist, gemessen an unseren Befunden, offensichtlich nicht der Fall. Ein beschleunigtes Absinken der an den Zellwänden angelangten Viruspartikel ist für die Auswertung bei 70- bis 90prozentiger Aktivitätsabnahme belanglos, da die Menge des hierfür in Betracht kommenden Virusanteils zu klein ist, um das Ergebnis überhaupt beeinflussen zu können.

O. DREES und P. BOESCHE

*Laboratorium der Stiftung zur Erforschung der spinalen Kinderlähmung und der Multiplen Sklerose, Hamburg-Eppendorf, den 2. März 1957.*

#### Summary

An attempt is made to determine the sedimentation constant by means of biological assay in animal viruses. A new type of electromagnetic high speed centrifuge (Type ZF 3) was used for this purpose. An essential feature of this model is that the entire volume for assay is included in one single cell positioned at an angle of 90° to the axis of rotation. The murine EMC virus was used to show that the centrifuge is suitable for the biological determination of S-values, in spite of the fact that the gravitational field in the cell is inhomogeneous and that the cell walls are not adapted to the radial migrational direction of the centrifuged particles.

<sup>5</sup> H. T. EPSTEIN und M. A. LAUFFER, Arch. Biochem. Biophys. 36, 371 (1952).

<sup>6</sup> O. DREES, erscheint demnächst in Kolloid-Z.