

rapidement; il peut faire défaut. Le gradient x est un peu mieux représenté et reste repérable pendant toute l'expérience.

Quand on soumet un tel extrait à la dialyse contre de l'eau distillée, il se forme un précipité abondant (25%) de globuline X et de myogène dénaturé. Les protéogrammes indiquent que ce précipité s'est fait aux dépens de b , de a'' et de c , tandis que a' , a''' et x ne sont pas modifiés (Fig. 2).

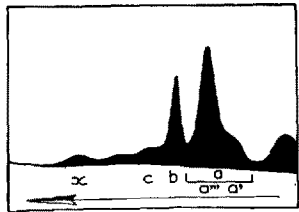


Fig. 2. Protéinogramme (compartiment anodique) du même liquide après dialyse préalable contre de l'eau distillée et élimination du précipité, puis dialyse contre un tampon phosphates sodiques $\text{-NaCl } \mu = 0,10$, $\text{pH} = 7,1$ (16,400 s d'électrophorèse; champ: 5,23 volt/cm; concentration protéines: 3,72%). Si x n'a pas changé, c est nettement réduit; b a perdu une partie de ses constituants et a sa fraction moyenne a'' .

En conclusion, le liquide exsudant du muscle en contraction de décongélation entraîne une quantité importante de protéines; celles-ci appartiennent au groupe des albumines et de la globuline X, à l'exclusion de tout représentant des myosines. La solution est plus concentrée que celle que l'on peut obtenir en extrayant la pulpe musculaire par une solution phosphatique.

J. GODEAUX

Laboratoire de Biologie générale, Faculté des Sciences de l'Université de Liège, Fonds National Belge de la Recherche Scientifique, le 5 juillet 1957.

Summary

Because of cell membrane destruction, fluid escaping a muscle on thawing contains a large amount of proteins (myogen and globulin X). Whilst usual gradients a , b , and c are present in the fluid, the gradients d and e also occurring in extracts of unstimulated frog muscles are replaced by the gradient x already found in extracts of in N_2 exhausted muscles.

Inactivation of Catalase by Phospholipide Extracts

It was reported in a previous paper¹ that phospholipides extracted from yeast or from rat or rabbit liver form a precipitate when added to a solution of cytochrome c . The precipitate contains a large amount of cytochrome c and a phospholipide portion. The cytochrome c can be redissolved from the precipitate with ether, but its absorption spectrum is modified. Phospholipides from yeast or liver produce a precipitate also when added to a solution of iron salts such as ferrous sulphate or ferric ammoniacal citrate. It seemed then possible that phospholipide acts on the iron part of the molecule of cytochrome c . The present paper reports

Table I

Inhibition of crystalline beef liver catalase by phospholipide extracts

Phospholipide extract added	Microliters O_2 developed
Rabbit liver lecithin fraction	0
Rabbit liver sphingomyelin fraction	65
Yeast lecithin fraction	10
Yeast sphingomyelin fraction	10
Rat sarcoma lecithin fraction	12
Rat sarcoma sphingomyelin fraction	140
None	467

Each value represents the mean of 3 experiments, with the exception of the value of the controls without phospholipide added, which represents the mean of 9 experiments.

the inhibition *in vitro* by phospholipides of catalase, an enzyme which contains bound iron.

Several investigations on the inhibition of this enzyme by tissue extracts have been reported. HARGREAVES and DEUTSCH² have shown that tumor tissue exerts an inhibitory action on liver catalase. GREENFELD and PRICE³ found a decrease of catalase activity in the liver of tumor-bearing animals. CERIOTTI and SPANDRIO⁴ have recently described that an inhibiting action on catalase is present not only in tumor, but also in normal tissues. CERIOTTI, SPANDRIO, and BERTI⁵ reported in a further publication that several amino acids are able to inhibit catalase. Phospholipides used in the present investigation were prepared from yeast, from rat or rabbit liver, or from a rat spindle cell sarcoma (Galliera sarcoma), by the same method used in the previous work. Crystalline beef liver catalase was prepared according to the method of SUMMER and DOUNCE⁶. Catalase activity was determined at 37°C with Warburg manometers, by measuring the amount of oxygen liberated in 3 min from 3 ml of a 1%/₀₀ perydrol (Merck) solution. The enzyme (0.2 of a 1%/₀₀ solution) was added from the side arm of the Warburg flasks after 7 min preincubation. In the experiments in which the influence of phospholipide extracts was to be tested, 0.1 ml of the emulsion containing 100 mg phospholipide in 5 ml water was mixed with the enzyme in the side arm of the Warburg flasks.

The results are reported in Table I. It seems clear that phospholipide extracts from rabbit liver, from rat sarcoma, or also from yeast exert a strong inhibitory action on purified catalase. Yeast sphingomyeline fraction is more active than that prepared from rabbit liver or from rat sarcoma. In other experiments, the influence of the *in vivo* treatment with phospholipides on catalase activity of the liver and of the kidney of guinea pigs was studied.

Guinea pigs weighing 300 g fed on a semi-synthetic diet were injected in the jugular vein with a dispersion of yeast lecithin fraction containing 100 mg of this substance. The animals were then killed by bleeding, 30 h after the injection. The livers and the kidneys were

² A. B. HARGREAVES and H. J. DEUTSCH, Cancer Res. 12, 720 (1952).

³ R. E. GREENFELD and V. E. PRICE, J. biol. Chem. 209, 363 (1954).

⁴ G. CERIOTTI and L. SPANDRIO, Biochim. biophys. Acta 18, 303 (1955); Tumori 41, 538 (1955).

⁵ G. CERIOTTI and BERTI, Biochim. biophys. Acta 23, 362 (1954).

⁶ J. B. SUMNER and A. L. DOUNCE, J. biol. Chem. 121, 417 (1937); 127, 439 (1939).

¹ L. MICHELAZZI, Exper. 11, 389 (1955).

Table II

Catalase activity of the liver and the kidney of normal guinea pigs and guinea pigs injected with yeast lecithin fraction

Exp. No.	Animal	Liver $\mu 1 O_2$	Kidney $\mu 1 O_2$
1	Normal	299	62
2	Normal	292	61
3	Treated	302	72
4	Treated	300	61

immediately removed, transferred in the cold room at 2°C and weighed. The homogenates (100 mg tissue in 10 ml 0.25 M sucrose) were prepared in a Potter-Elvehjem glass apparatus, and then centrifuged at 1500g for 10 min. The supernatant after this centrifugation was diluted 500 times with water. 2.6 ml of this solution were used for the determination of enzyme activity. In these experiments, perydrol (0.3 ml of a 1% solution) was placed in the side arm of the flask and mixed with the enzyme after 7 min necessary for temperature equilibration. As Table II shows, no decrease of liver or kidney catalase activity was recorded in these experiments. The mechanism of the inhibition of purified catalase by phospholipide extracts *in vitro* is difficult to understand, but it seems possible that a reaction with the iron bound to the enzyme molecule is involved, as in the case of cytochrome *c*. It is impossible, in the experimental conditions used in this paper, to think that the inhibition is due to the presence of free amino acids in phospholipide extracts, because free amino acids were not revealed in this material by paper chromatography.

L. MICHELAZZI

Department of General Pathology of the University of Genoa (Italy), July 9, 1957.

Riassunto

L'autore, analogamente a quanto ha già dimostrato avvenire per il citocromo *c*, mette in evidenza una potente azione inattivante la catalasi da parte dei fosfolipidi estratti da tessuti e dal lievito.

Die Wirkung der Sulfationen auf das Membranpotential der isoliert durchströmten Säugetiermuskulatur

Isolierte Froschmuskel, in Natriumsulfatringer inkubiert, zeigen Erscheinungen (Fibrillationen, Nachkontraktionen bei direkter Reizung), die durch eine Herabsetzung der Kalziumionenkonzentration erklärt wurden (FREY¹). Nach teilweisem Ersatz der Chlorid- durch Sulfationen in der Durchströmungsflüssigkeit isolierter hinterer Extremitäten von Katzen konnten wir jedoch kürzlich eine Reihe von Beobachtungen anstellen, die nicht allein mit einer dekalzifizierenden Wirkung der Sulfationen erklärt werden können; hierbei konnten wir zeigen, dass 1. unmittelbar nach der Umschaltung auf die sulfathaltige Durchströmungsflüssigkeit eine von der Höhe der Sulfatkonzentration abhängige zeitlich ziem-

lich konstante Steigerung der Kaliumfreisetzung aus der Muskulatur erfolgte (KRAUPP *et al.*²), 2. gleichzeitig damit eine mehrere Minuten andauernde reversible Kontraktur der Muskulatur auftrat (KRAUPP *et al.*²) und 3. während der Durchströmung mit sulfathaltiger Tyrodelösung eine dauernde beträchtliche Steigerung der Empfindlichkeit der Muskulatur gegenüber intraarteriell verabreichtem Acetylcholin (Kontrakturwirkung) in Erscheinung trat (STORMANN *et al.*³). An derselben Versuchsordnung rief Kalziumionenentzug allein die unter 1. angeführten Wirkungen nur in sehr geringem Ausmass, die in 3. angegebenen nur vorübergehend und die unter 2. erwähnte Kontrakturwirkung überhaupt nicht hervor (KRAUPP *et al.*⁴). Zum näheren Verständnis der Wirkung der Sulfationen auf die quergestreifte Muskulatur wurden in den nachstehend mitgeteilten Experimenten die bei Durchströmung mit Sulfationen ablaufenden elektrischen Veränderungen an den Membranen der Muskeln von hinteren Katzenextremitäten gleichzeitig mit den Kaliumverschiebungen untersucht.

Methodik. An isoliert durchströmten hinteren Extremitäten von Katzen (KRAUPP *et al.*⁴) wurde das Membranpotential des Musculus gracilis *in situ* mit Glasmikroelektroden (gefüllt mit 3M-KCl, 2–10 MΩ, Tippotential: unter 10 mV, ADRIAN⁵) intrazellulär registriert. Die Registrierung der Muskelspannung erfolgte am Musculus gastrocnemius mit Hilfe eines Dehnungsmeßstreifens und eines Sanborn Strain Gage Amplifiers sowie Direktschreibers (KRAUPP *et al.*⁴). Die Kaliumkonzentration wurde flammenphotometrisch und die Chloridkonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit nach der Methode von SCHALES und SCHALES⁶ gemessen. Die Einstellung verschiedener Sulfatkonzentrationen erfolgte durch entsprechenden Ersatz des NaCl durch Na₂SO₄ 1. in der Durchströmungsflüssigkeit und 2. in der den Musculus gracilis bedeckenden Flüssigkeit (flüssigkeitsdichte Hauttasche am Oberschenkel) in der Weise, dass die Natriumkonzentration unverändert blieb und je zwei Mol Cl durch ein Mol SO₄ ersetzt wurden. Die Osmolarität wurde durch Zusatz von Saccharose aufrecht erhalten.

Ergebnisse. In 228 Einzelmessungen betrug der Mittelwert des Ruhepotentials bei normaler Durchströmung: $-91,6 \pm 6,7$ mV (Standardabweichung). Nach Umschaltung auf chloridarme und sulfathaltige Durchströmungsflüssigkeiten trat gleichzeitig mit einem Ansteigen der venösen Kaliumkonzentration eine von der Höhe der Sulfatkonzentration bzw. Chloriderniedrigung abhängige Senkung des Ruhepotentials des Gracilismuskels in Erscheinung (Abb. 1). Die Sulfationenkonzentration betrug dabei in allen Versuchen den halben Wert der Chloridkonzentrationserniedrigung (siehe auch Methodik); alle anderen Ionenkonzentrationen wurden dabei konstant gehalten.

Die Messung des Ruhepotentials im Zeitpunkt der maximalen Depolarisation war schwierig durchzuführen, da die nach Einstich der Mikroelektroden gemessenen Potentialwerte zum Unterschied von dem Verhalten bei normaler Durchströmung nur kurze Zeit konstant blieben und immer wieder sprunghafte Änderungen auf etwas niedrigere oder höhere Potentialwerte zeigten.

² O. KRAUPP, B. PILLAT, H. STORMANN und P. H. CLODI, *Biochem. Z.* 329, 209 (1957).

³ H. STORMANN, O. KRAUPP, B. PILLAT und P. H. CLODI, *Arch. exper. Path. Pharmacol.* 1957 (im Druck).

⁴ O. KRAUPP, H. STORMANN, B. PILLAT und P. H. CLODI, *Arch. exper. Path. Pharmacol.* 229, 419 (1956).

⁵ R. H. ADRIAN, *J. Physiol.* 133, 631 (1956).

⁶ O. SCHALES und S. SCHALES, *J. biol. Chem.* 140, 879 (1941).

¹ E. FREY, *Arch. exper. Path. Pharmacol.* 98, 21 (1923).