

Separation of the Phosphorus Compounds Present in the Acid-Soluble Fraction of Bovine Retina

Once the function of phosphorus in muscular work had been established, the question arose whether the phosphorus compounds have some function in vision as well, since, for its production, the energy from phosphorus compounds, which develops rapidly, seemed very suitable.

Nevertheless, although a great number of works have been dedicated to the solution of the problem and have succeeded in confirming the presence in the retina of a considerable quantity of organic and inorganic phosphorus, so far no intensive efforts have been made to isolate the various phosphorus compounds present in the acid-soluble fractions of the retina, if exception be made of the data of HOARE and KERLY¹ and of VENKSTERN². In my previous researches³, I have been able to demonstrate that, in the retina, the phosphorus compounds with a high content of energy prevail.

The data obtained by means of the effect dialysis and of activators and inhibitors (KERLY and BOURNE⁴, SÜLLMANN and VOSS⁵) have permitted the conclusion that, for the retina also, the formation of lactic acid follows the same route of phosphoric glycolysis as in extracts of muscle; nevertheless the intermediate phosphoric esters have not been isolated.

There are few data on these important compounds: I have therefore thought it of particular interest to carry out a systematic research with the special aim of elaborating an analytical method that would avoid those inconveniences that inevitable occur whenever an attempt is made to apply the classical technique of LE PAGE⁶ to the retina.

Experimental part.—Bovine retinas removed from the eyeballs immediately after slaughter of the animal and frozen in dry ice are submitted to cold extraction with 6 volumes of 3% perchloric acid. The acid filtrate is treated with a mixture of equal parts of Norite-celite, 200 mg per 5 ml of the extract, to get rid of the nucleotides. These are then eluated from the Norite-celite with 10% aqueous pyridine. The pyridine extract is then lyophilized and preserved for the chromatographic analysis. The filtrate, after treatment with Norite-celite, is treated with ammonium molybdate to remove the free as well as the creatinic phosphorus. The excess of molybdate is precipitated by H₂S. After removal of the excess of H₂S by bubbling air through, the phosphoric esters remaining are precipitated as salts of barium in excess of alcohol, then resuspended in H₂O, and treated with Amberlite (IR-120 H). The liquid is lyophilized and preserved for chromatographic analysis. This is performed both for the phosphoric esters and for the nucleotides, using the unidirectional ascending technique at 22°C. The strips were Whatman paper No. 1 (35 × 18) and the solvent used was made up of 15 ml of 30% trichloroacetic acid, 25 of 80% formic acid, 40 of normal butanol, 20 of normal propanol, 25 acetone.

¹ D. S. HOARE and M. KERLY, *Biochem. J.* **58**, 38 (1954).

² T. V. VENKSTERN, *Uspehi sovremennoy Biologii*.

³ E. DE BERARDINIS and G. AURICCHIO, *Ann. oft. Cl. ocul.* **77**, 1 (1951); **78**, 53 (1952).

⁴ M. KERLY and M. BOURNE, *Biochem. J.* **34**, 563 (1940).

⁵ H. SÜLLMANN and T. A. VOSS, *Enzymologia* **6**, 246 (1939).

⁶ J. A. LE PAGE, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism* (N. W. Umbreit and R. H. Burris, Burgess Publ. 1949).

	Determined	Calculated
Inorganic phosphorus P _i	25.8	—
Creatinic phosphorus P _c	11.4	11.0
Fraction 1 phosphorus	5.0	10.8
Fraction 2 phosphorus	7.1	—
Total extract phosphorus	48.0	49.3

To demonstrate the phosphorus compounds on the chromatograms, the technique of BANDURSKI and AXELROD⁷ was used. In the Table, the relative values in the distribution of the phosphorus in the various fractions are reported. The values are expressed in mg of P/100 g of fresh retina and represent the mean values of several determinations.

In the first column the values of the phosphorus determined experimentally are given, while the second column contains the values determined indirectly, that is calculated. The P_c was in fact determined both directly after precipitation of the P_i and indirectly as the difference between free inorganic P and 'true' inorganic P, that is P_i. Thus the fractions 1–2 were determined both directly after incineration and by the difference between the total P and P_i + P_c.

The total P calculated on the basis of single values obtained experimentally (see column I) differs somewhat (2.5%) from that determined in the extract, which is probably due to the fact that, in the fractions 1–2, free phosphorus was still present to some small degree.

Further data and considerations will be given when the work is presented *in extenso*.

E. DE BERARDINIS

Ophthalmic clinic of the University of Naples (Italy), May 27, 1958.

Riassunto

L'autore ha studiato i composti fosforici della retina interessati nella glicolisi, mediante una tecnica combinata chimica e cromatografica. Tale tecnica ovvia agli inconvenienti legati alle classiche tecniche di LE PAGE ed HANES e HESHERWOOD. I risultati ottenuti confermano l'esistenza nella retina di un attivo metabolismo glicidico che segue la via normale senza pertanto escludere una possibile via collaterale.

⁷ R. S. BANDURSKI and B. AXELROD, *J. biol. Chem.* **193**, 405 (1951).

Studio comparativo degli aminoacidi presenti negli estratti e negli idrolizzati di retina e di epitelio corneale di bue

L'interesse sempre crescente per lo studio della distribuzione degli aminoacidi liberi, quale spia del ricambio proteico in un dato tessuto, mi ha indotto ad affrontare questo genere di studio nel caso della retina e dell'epitelio corneale. Ho pertanto stabilito il quadro normale degli aminoacidi liberi in questi due tessuti, nonché il numero ed il tipo di aminoacidi presenti negli idrolizzati di questi tessuti, essendo la letteratura al riguardo scarsa e frammentaria¹.

¹ A. J. SCHAEFFER, *Docum. ophthal.* **5**, 403 (1951).

Quadro degli aminoacidi liberi rispetto agli aminoacidi presenti negli idrolizzati dei tessuti *in toto*

Aminoacidi	Epitelio corneale		Cornea	Retina	
	Estratto	Idrolizzato	Idrolizzato	Estratto	Idrolizzato
Leucina	+	+	+	+	+
Isoleucina	(+)	+	(+)	(+)	+
Fenilalanina		(+)	+		+
Metionina					+
Valina		+	+		+
Tirosina	+	+	+	+	+
Prolina					+
Ossiprolina					(+)
Alanina	+	+	+	+	+
Arginina	(+)	+	+		+
Treonina	+	+	+		+
Istidina		+	+		+
Glicina	+	+	+	+	+
Lisina		+			+
Serina	+	+	(+)		+
Acido Glutamico	+	+	+	+	+
Acido Aspartico		+	+	+	+
Cistina	(+)			-	-

La crocetta fra parentesi sta ad indicare la probabile presenza dell'aminoacido.

Come materiale di studio sono state usate retina, epitelio corneale e cornea di bue, prelevati il più presto possibile dopo l'uccisione dell'animale e conservati in ghiaccio secco a -20°C fino al momento dell'uso. Gli aminoacidi liberi venivano estratti dalla retina e dall'epitelio corneale con 5 volumi di acqua distillata fredda; l'estratto veniva deproteinizzato con acido tricloroacetico al 10% (concentrazione finale) e l'eccesso di acido veniva rimosso mediante ripetute estrazioni con etere. Dopo evaporazione dell'estratto così trattato, il residuo veniva ripreso con isopropanolo al 10%.

Gli idrolizzati di retina, cornea ed epitelio corneale venivano preparati idrolizzando campioni da 200-300 mg di tessuto con 25 ml di una miscela in parti uguali di HCl 6 N e HCOOH al 90% per 24 h, in pallone munito di refrigerante a ricadere. L'idrolizzato veniva filtrato, portato a secco sotto vuoto, ripreso con acqua distillata, riportato a secco e ripreso con isopropanolo al 10%.

Sia gli estratti che gli idrolizzati venivano analizzati mediante cromatografia su carta. È stata usata la tecnica bidimensionale ascendente; Carta Whatman n° 1 in fogli 28×28 cm; temperatura 26°C . Come primo solvente è stata usata la miscela butanolo-acido acetico-acqua (40/10/50), come secondo solvente fenolo all'80%. Gli aminoacidi separati venivano evidenziati spruzzando i fogli con ninidrina alcoolica e paragonati con varie mappe allestite con aminoacidi puri, nelle medesime condizioni sperimentali.

I risultati ottenuti sono riportati brevemente nella Tabella seguente. In essa la presenza sicura di un aminoacido è indicata con una crocetta; nei casi dubbi, sia per scarsa risoluzione dell'aminoacido sia per la esigua quantità presente, la crocetta è racchiusa fra parentesi. Nella Tabella non figurano dati quantitativi né per gli aminoacidi liberi né per quelli presenti nell'idrolizzato. Infatti, nel primo caso la concentrazione varia, oltre che col sesso, età, ecc. dell'animale, anche col metodo di uccisione. Per di più, l'azione *post mortem* delle proteasi altera la concentrazione degli aminoacidi liberi, specialmente in casi, come questo, in cui i tessuti interessati non possono essere rimossi *immediatamente dopo* l'uccisione dell'animale. Nel secondo caso poi la composizione percentuale in aminoacidi non può essere di alcuna utilità, data la struttura

complessa dei tessuti (per esempio la retina). Accanto a questi motivi, per così dire, contingenti, sta la incertezza insita proprio in qualsiasi metodo di determinazione quantitativa degli aminoacidi separati mediante cromatografia su carta.

Dalla Tabella appare evidente che il quadro degli aminoacidi liberi è una caratteristica del tessuto esaminato, pur non rispecchiando fedelmente la sua composizione in aminoacidi. Ciò risulta più chiaramente nel caso della retina che non in quello dell'epitelio corneale, trovando una spiegazione logica nella maggiore complessità istologica della retina (presenza di vasi sanguigni, linfatici, pigmenti, ecc.). L'epitelio corneale, inoltre, presenta un numero di aminoacidi nel suo idrolizzato maggiore di quello presentato dalla cornea intera. Tale discrepanza è solo apparente, in quanto dovuta al fatto che nell'idrolizzato di cornea intera gli aminoacidi tipici dell'epitelio sfuggono all'osservazione data la loro bassa concentrazione percentuale.

Accanto a queste diversità di natura qualitativa ve ne sono altre di natura quantitativa che non risultano evidenti dalla Tabella su riportata. Alcuni aminoacidi, infatti, figurano in proporzione nettamente diversa negli idrolizzati e negli estratti (valutazione eseguita in base alla intensità relativa delle macchie). Nel caso della retina, tra gli aminoacidi liberi figurano in quantità prevalente glicina ed acido glutamico, mentre alanina è appena percettibile; nell'idrolizzato invece quest'ultimo aminoacido è presente in ragguardevole proporzione rispetto agli altri, compresi glicina ed acido glutamico. Nel caso dell'epitelio corneale tale stridente contrasto è meno evidente. Questa diversa distribuzione indica che fra gli aminoacidi liberi figurano non solo quelli interessati nel normale processo di sintesi e demolizione delle proteine tissutali ma anche alcuni altri aventi un ruolo metabolico speciale. È questo il caso per esempio dell'acido glutamico di cui sono noti i numerosi e molteplici processi biochimici ai quali prende parte.

Ulteriori dati sperimentali e considerazioni verranno esposti altrove in un lavoro *in extenso* di prossima pubblicazione.

E. DE BERARDINIS

Clinica oculistica universitaria, Napoli, il 12 giugno 1958.

Zusammenfassung

Mittels Papierchromatographie wurde das Bild der freien Aminosäuren der Netzhaut und des Cornea-Epithels des Rindes untersucht und mit den Aminosäuren des Hydrolysats des gesamten Gewebes in Beziehung gebracht. Die Ergebnisse zeigen, dass das Bild der freien Aminosäuren ein charakteristischer Zug eines bestimmten Gewebes ist, obwohl er nicht ganz genau dessen Zusammensetzung an Aminosäuren wiedergibt.

Diurnal Changes in the Brain Glycogen

As changes in the concentration of brain glycogen parallel several altered states of behaviour¹, the question arises what connection this brain metabolite has to autonomic functions which are regulated at the highest level. In the present report, the rhythms of sleep and wakefulness were chosen as representative of these functions.

In 123 rats the concentration of brain glycogen was determined in 6-h intervals in five topographical regions of the brain. The same method was used as described in a preceding paper².

Diurnal changes of glycogen in the cerebral cortex and the diencephalon

Astronomic time	Glycogen (mg/100 g of wet weight)*			
	Cerebral cortex	n	Diencephalon	n
0	91 ± 5.2	31	117 ± 3.8	28
6	86 ± 4.6	34	131 ± 6.2	25
12	89 ± 5.4	28	135 ± 4.2	26
18	90 ± 4.1	30	127 ± 5.1	28

* Mean ± S. E.

In the Table the characteristic results of these experiments are given. From these it follows that, while there are no significant periodic changes in the cerebral cortex, the mesencephalon, cerebellum, and medulla oblongata, there is a significant difference in the diencephalon ($P < 0.01$ between the interval 0 and 12).

The maximal concentration of glycogen in the diencephalon coincides with the period during which there is a maximal readiness of the rat to the cerebral inhibitory state³.

D. SVORAD

Institute of Physiology, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (Czechoslovakia), June 25, 1958.

Zusammenfassung

In 6stündigen Intervallen wurde bei der Ratte die Konzentration des Glykogens in der Hirnrinde sowie im Diencephalon, Mesencephalon, Cerebellum und im verlängerten Mark festgestellt. Innerhalb von 24 h tritt im Diencephalon – und nur in diesem – periodisch eine signifikante Veränderung der Glykogen-Konzentration ein.

Effect of Aldosterone and Hydrocortisone on Sodium in Red Cells

Studies with aldosterone in the rat have recently led us to the theoretical conclusion that this steroid, and perhaps related ones as well, can act by conditioning sodium flux across cell membranes. We have suggested that the net effect favors an increase in intracellular sodium, possibly by hindering sodium transport (efflux¹). The red cell seemed particularly appropriate for a direct experimental approach to this postulate. GLYNN also predictively considered this but was unable to demonstrate any effect². He used red cells in a buffered medium, however. It seemed to us that the problem could not be definitively settled unless plasma were used as medium since quite possibly a cofactor or carrier is required. Further, it seemed desirable to subject the cells to forcing procedures favoring separately either influx or efflux. Accordingly, our experiments were designed to use whole blood and to follow the changes in plasma [Na] and [K] during refrigeration or subsequent rewarming. In view of our inexperience in the difficult field of red cell experimentation and of the inherent variability of whole blood studies, experiments were freely repeated. Well defined effects were demonstrated both with aldosterone and with hydrocortisone.

Methods. – Fresh blood from student volunteers was collected in heparin (0.2 ml/10 ml blood), centrifuged, and the buffy coat removed. The blood was then reconstituted. It was divided into 5 ml aliquots and each was sampled separately for the determination of plasma Na and K and of hematocrit. The aliquots were then transferred to prepared tubes containing the steroid in 0.1 ml of vehicle, or the vehicle alone. In cooling experiments the tubes were placed in a refrigerator at 4°C and sampled in the cold 2, 4, 6 or 24 h later. While in the refrigerator, they were inverted gently every half hour throughout the day. In rewarming experiments, untreated 5 ml aliquots were first refrigerated for 24 h and then sampled separately in the cold before transfer to fresh tubes containing the steroid or vehicle. Sampling was again carried out after 0.5, 1, 2, and 3 h of rewarming at 37°C. Aldosterone racemate in ethyl alcohol and hydrocortisone acetate in saline were used.

Calculations were based on the change in each datum from its own base value taken as zero. Regression coefficients were determined where applicable³. Further details are given with each experiment.

Results. – *Effect of aldosterone on Na, K, and hematocrit during rewarming.* Aliquots (5 ml) containing 1, 1.4, 1.8, and 2.0 µg/ml of aldosterone racemate, or the vehicle alone, were rewarmed and sampled as described. Five separate runs were carried out. The figure presents the essential findings. Aldosterone clearly depresses the rate of Na extrusion during rewarming. This is preceded during the first half hour by a fall in plasma [Na] which is most prominent at lower doses. The proportionality of the effect is shown by the decreasing values of the regression coefficient with increasing dose (Table I). The effects on Na are not accompanied by similar changes in K or hematocrit; these show the normal patterns of rewarming.

¹ S. M. FRIEDMAN, C. L. FRIEDMAN, and M. NAKASHIMA, *Amer. J. Physiol.* (in press for Dec. 1958).

² I. M. GLYNN, *J. Physiol.* 136, 148 (1957).

³ R. A. FISHER, *Statistical Methods for Research Workers*, 12th ed. (Oliver and Boyd, Edinburgh 1954).

¹ M. R. A. CHANCE and D. C. YAXLEY, *J. exp. Biol.* 27, 311 (1950).

² N. SHIMIZU and Z. KUBO, *J. Neuropath. exp. Neurol.* 16, 40 (1957).

³ D. SVORAD, *Nature* 181, 775 (1958).

⁴ D. SVORAD, *Physiol. Bohemoslov.* (1958), in press.