

événements morphogénétiques et histogénétiques dont le cerveau est le siège durant cette période du développement. Du mésoblaste axial, le matériel chordal est le premier à s'individualiser, contrairement à ce qu'on observe chez les amphibiens. La conversion du matériel chordal en somites observée chez les amphibiens (LEHMANN¹⁰; PASTEELS⁹) ne se rencontre jamais chez le poulet.

Corrélativement à l'importance de l'atteinte, l'expansion du mésoblaste extra-embryonnaire, qui engendre l'aire vasculaire, est plus ou moins bloquée en cours de progression.

Summary. The young blastoderms cultivated *in vitro*, by the method of New, slightly modified, grow ab-

normally on a medium of albumen mixed with LiCl solution. It acts in the first place upon the morphogenesis, secondarily upon the differentiation of organs, if they are able to develop.

G. NICOLET

Laboratoire d'Embryologie expérimentale à l'Institut d'Anatomie de l'Université de Genève (Suisse), le 2 mai 1961.

⁹ J. PASTEELS, Arch. Biol. 56, 105 (1945).

¹⁰ F. E. LEHMANN, Roux Arch. Entw. Mech. 136, 112 (1937).

Cytochrome Oxidase Activity in Skeletal Muscle and the Diaphragm of Intermittently Starving Rats

Previous findings from our laboratory revealed that, in rats adapted to intermittent starvation, there are a number of functional and morphological changes¹. The energy metabolism of these animals is characterized by an increase in QO_2 of tissues² and in the basal oxygen consumption *in vivo*³. We investigated, therefore, whether these changes are reflected in the activity of the terminal respiratory enzyme—cytochrome oxidase—particularly in skeletal muscle.

The enzyme activity was estimated manometrically, using the method described by SCHNEIDER and POTTER⁴ at a temperature of 39°C. In experiments with skeletal muscle, the rat was sacrificed, skinned and, after evisceration, the fat was mechanically separated. The muscles and skeleton were homogenised in distilled water (1:9) by the procedure described by JÁNSKÝ⁵ in an ice-cooled Turmix-homogenizer and aliquot portions in a Potter-Elvehjem homogenizer. The skeleton has, according to preliminary experiments, a minimal cytochrome oxidase activity. To the diaphragm distilled water was added, one hundred times its weight. In the homogenates, the nitrogen was estimated by the Microkjeldahl method. All animals were included in the experiment after 24 h fasting; before fasting the animals received a weighed ration.

Male rats, Wistar strain, were used. Some of the animals were adapted to intermittent starvation as follows: during the first two weeks, they were fed on alternate days; during the subsequent two weeks, three times a week, and for the remainder of the experiment (2–6 weeks) only twice a week. The total caloric intake of these animals was by about 30–40% lower than in *ad libitum* fed controls. Another group was fed daily, for a period of 6–8 weeks, a reduced ration, corresponding to ca. 60% of the caloric intake of the control animals. All groups were fed a standard diet, containing 50% of the caloric volume of carbohydrate, 25% fat and 25% protein⁶.

As demonstrated in the Table, the cytochrome oxidase activity (when calculated in relation to the nitrogen content of the tissue) is significantly higher in intermittently starving animals, both in skeletal muscle and the diaphragm. In rats fed daily a reduced ration, there is practically no change, as compared with the control group.

Among other consequences, intermittent starvation leads to an overall increase of metabolism. As has been shown in a previous paper³, this increase is probably mainly due to the higher nutrient supply during periods of food intake when intermittently starving rats develop

considerable hyperphagia. The greater demands on the metabolism resulting from the intermittent increase of nutrient supplies probably lead to the establishment of a higher metabolic level. Finally a change of the enzyme systems involved, in this case cytochrome oxidase, develops. The results of experiments with rats subjected to simple chronic caloric undernutrition support this assumption. These animals have practically the same food intake as rats adapted to intermittent starvation but no changes in the QO_2 or in the cytochrome oxidase activity can be detected in these animals.

The observed increase of cytochrome oxidase activity in rats accustomed to intermittent starvation is interesting, as it is known that levels of this enzyme decrease with age⁷. Thus, the elevated values found in our experiments, similarly as other findings in rats adapted to this nutritional pattern (growth activity of explanted muscle and liver⁸, higher QO_2 levels of tissues², increased basal oxygen consumption *in vivo*³) correspond to a lower biological age of the animal.

Cytochrome oxidase activity in skeletal muscle and diaphragm of intermittently starving rats (in $\mu\text{l O}_2/\text{mg N/h}$)

Group	Number of animals	Weight g	Skeletal muscles and skeleton	Diaphragm
Controls	12	204.5 ± 7.9	65.01 ± 14.14	759.50 ± 77.59
Intermittent starvation	6	128 ± 9.4	144.95 ± 28.45 ^b	1304.53 ± 153.71 ^a
Simple under-nutrition	6	110 ± 7.1	81.10 ± 16.3	828.92 ± 87.14

The figures are averages ± S.E. ^a The difference of values as compared with controls is statistically significant for $P < 0.01$. ^b for $P = 0.02$.

¹ P. FÁBRY, Physiol. bohemoslov. 4, 33 (1955). – P. FÁBRY and V. KUJALOVÁ, Naturwissenschaften 45, 373 (1959). – R. PETRÁSEK, Nature (Lond.) 183, 323 (1959). – E. HOLEČKOVÁ and P. FÁBRY, Brit. J. Nutr. 13, 260 (1959). – P. FÁBRY, V. KUJALOVÁ, and R. PETRÁSEK, Nahrung 3, 642 (1959).

² R. PETRÁSEK, Čs. fysiologie 9, 453 (1960).

³ P. FÁBRY, R. PETRÁSEK, and L. KRULICH, Physiol. bohemoslov., in press (1961).

⁴ W. C. SCHNEIDER and V. R. POTTER, J. biol. Chem. 149, 217 (1943).

⁵ L. JÁNSKÝ, Acta Soc. zool. Bohemoslov. 21 (2), 164 (1957).

⁶ P. FÁBRY, Čs. fysiologie 8, 529 (1959).

⁷ H. O. KUNKEL and J. E. CAMPBELL, J. biol. Chem. 198, 229 (1952).

⁸ E. HOLEČKOVÁ, O. POUPA, and P. FÁBRY, Physiol. bohemoslov. 8, 15 (1959).

Zusammenfassung. Es wurde die Aktivität der Cytochromoxydase von Skelettmuskulatur und Zwerchfell intermittierend hungernder Ratten und bei chronisch durch verminderte Tagesrationen unterernährten Ratten untersucht. Bei den an intermittierendes Hungern adaptierten Ratten war die auf den Gewebestickstoff bezogene Aktivität dieses Enzyms um 80–100% erhöht im Vergleich zu den *ad libitum* gefütterten Kontrolltieren. Bei

den einer gewöhnlichen kalorischen Unterernährung ausgesetzten Tieren war die Cytochromoxydaseaktivität praktisch dieselbe wie die der Kontrolltiere.

R. PETRÁSEK

Physiological Department, Institute of Human Nutrition, Prague (Czechoslovakia), March 29, 1961.

Die Wirkung von Persantin auf Herzmuskel-Sarkosomen

Bei der klinischen und experimentellen Anwendung einer neuen coronargefässerweiternden Verbindung, dem 2,6-Bis-(diäthanolamino)-4,8-dipiperidino-pyrimido-(5,4- δ)-pyrimidin, Persantin®, wurden Ergebnisse erhalten, die für einen zusätzlichen Stoffwechseleffekt dieser Substanz sprechen. Neben einer echten Leistungssteigerung des Myocards^{1,2} konnte bei dekompensierten Herzinsuffizienzen unter der Persantintherapie ein schnellerer Rückgang der Transaminase-Aktivitäten des Serums sowie ein schnelleres Absinken der erhöhten Milchsäure- und Brenztraubensäure-Spiegel im Blut beobachtet werden^{3,4}. Es wurde ein direkter Eingriff in energieliefernde Stoffwechselprozesse vermutet, da beim Hund nach hypoxämischer Schädigung des Herzens die erniedrigten ATP-Werte der Herzmuskulatur unter Persantin deutlich anstiegen⁵. Persantin inhibiert nach SISS den Erschöpfungs- und Energiemangelstillstand des Rattenvorhofs, eine Beobachtung, welche von ihm auf Stoffwechsel-Effekte zurückgeführt wird⁶.

Im Stoffwechsel erfolgt der Aufbau energiereicher Phosphatverbindungen vom Typ der ATP hauptsächlich durch oxydative Phosphorylierung in den Mitochondrien. Wir untersuchten deshalb den Einfluss verschiedener Konzentrationen von Persantin auf die oxydative Phosphorylierung von Herzmuskel-Mitochondrien (Sarkosomen) *in vitro*.

Die Sarkosomen wurden aus frischen Rinderherzen nach einer früher beschriebenen Methode isoliert; gleiches gilt auch für die Messung der P/O-Quotienten mit Succinat, β -Hydroxybutyrat und Ketoglutarat/Malonat im Warburg-Versuch^{7,8}. Insgesamt wurden 130 Manometer-Gefäß-Versuche durchgeführt. Neben frisch isolierten und morphologisch wie funktionell intakten Sarkosomen wurden vergleichsweise auch künstlich geschädigte Sarkosomen in die Versuche eingesetzt. Die Schädigung erfolgte durch Lyophilisierung und Resuspendierung frischer Sarkosomenfraktionen. Dadurch entstanden strukturelle Schäden der Partikel (Quellungen, partieller Zerfall) mit entsprechenden Funktionsausfällen (Senkung der P/O-Quotienten). Ähnliche morphologische Schäden und Funktionsausfälle bestehen auch *in vivo* bei Sarkosomen im hypoxämischen Myocard^{9–11}. Eine eingehende Beschreibung der Versuche erfolgt an anderer Stelle.

Ergebnisse. Wie die Tabelle I zeigt, wurde durch steigende Konzentrationen von Persantin bei frisch isolierten Sarkosomen die Sauerstoffaufnahme mit Succinat als Substrat zunächst stärker gesenkt als die Phosphataufnahme. Dadurch kam es zu einem geringen, statistisch jedoch nicht gesicherten Anstieg der P/O-Quotienten. Bei β -Hydroxybutyrat und Ketoglutarat/Malonat als Substrate war die Senkung der Sauerstoffaufnahmen unter Persantin sowohl bei Sarkosomen als auch bei Lebermitochondrien deutlich stärker und führte sogar zu einer *signifikanten* Steigerung der P/O-Quotienten (Tabelle II).

Konzentrationen ab 10^{-4} m Persantin/Ansatz hemmten dann bei allen Substraten die Phosphorylierung signifikant und zunehmend stärker als die Atmung.

Völlig anders verhielten sich geschädigte Sarkosomen unter Persantin: bei unveränderter Atmung wurde schon durch 1×10^{-6} bis 5×10^{-6} m Persantin/Ansatz die Phosphataufnahme gesteigert, die P/O-Quotienten stiegen um

Tab. I. Phosphat- und Sauerstoffaufnahmen von Rinderherz-Sarkosomen mit Succinat (0,005 m) als Substrat unter Persantin. 42 Versuche (24/18). Sarkosomen: 0,5 bzw. 0,8 mg N/Ansatz. Aufnahmen in μ g-Atomen. Die mit einem * bezeichneten P/O-Quotienten sind gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht.

Molarität von Persantin im Ansatz	Frisch isoliert			Geschädigt (Lyophilisat)		
	P	O	P/O	P	O	P/O
Kontrolle	3,74	2,14	1,75	1,54	1,50	1,03
1×10^{-6}	3,78	2,10	1,80	2,84	1,50	1,90*
5×10^{-6}	3,87	1,97	1,86	2,84	1,50	1,90*
1×10^{-5}	3,60	1,90	1,89	2,32	1,50	1,55
1×10^{-4}	2,88	1,63	1,77	0,40	1,31	0,31
1×10^{-3}	1,61	1,22	1,32	0,00	0,54	0,00

Tab. II. Beeinflussung der Phosphat- und Sauerstoffaufnahmen frisch isolierter Rinderherzsarkosomen durch Persantin bei Ketoglutarat/Malonat (je 0,01 m) und β -Hydroxybutyrat (0,01 m) als Substrate. 24 Versuche. Sarkosomen-N/Ansatz 0,68 mg bzw. 0,5 mg.

Molarität von Persantin im Ansatz	Ketoglutarat/Malonat			β -Hydroxybutyrat		
	P	O	P/O	P	O	P/O
Kontrolle	4,20	1,28	3,28	2,41	1,04	2,32
1×10^{-6}	4,22	1,26	3,35	2,45	1,06	2,31
5×10^{-6}	4,04	1,18	3,42	2,40	0,99	2,42
1×10^{-5}	4,00	1,15	3,48	2,50	0,94	2,66*
1×10^{-4}	3,82	1,01	3,78*	2,22	0,78	2,85*
1×10^{-3}	1,89	0,74	2,55	1,20	0,62	1,94

¹ H. W. KNIPPING, W. BOLT und K. MIKULICZ, Arzneimittelforsch. 10, 364 (1960).

² L. DÜTSCH, Ther. Gegenw. 99, 228 (1960).

³ E. ALBACH, Med. Welt 1960, 993.

⁴ S. GREIF, Wien. med. Wschr. 110, 463 (1960).

⁵ Th. HOCKERTS und G. BÖGELMANN, Arzneimittelforsch. 9, 47 (1959).

⁶ M. SISS, 27. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Kreislauf-Forschung, Bad Nauheim (1961).

⁷ G. LAUDAHN, Z. phys. Chem. 314, 95 (1959); 318, 186 (1960).

⁸ G. LAUDAHN und C. J. LÜDERS, Arzneimittelforsch. 10, 978 (1960).

⁹ F. BÜCHNER, Schweiz. med. Wschr. 88, 73 (1958).

¹⁰ E. MOELBERT und D. GUERRITORE, Beitr. path. Anat. 117, 32 (1957).

¹¹ E. MOELBERT, Beitr. path. Anat. 118, 203 (1957).