

(current \times time). Figure B comes from an experiment in cat cerebellar cortex and shows three lesions of 150–200 μ , centred on Purkinje cell layer, deep in granule cell layer and in molecular layer, respectively. These figures illustrate another advantage of acid lesions – the rapidity with which they can be produced. Exploration of the cerebellum is facilitated by traversing the long axis of folia at right angles, as shown in Figure B; this tends to make transitions between different regions more abrupt.

In order to pass currents of 1–10 μ A from the hydrochloric acid-containing barrel of a pipette with an overall tip size of 10–12 μ , we find it necessary to use 0.1 N hydrochloric acid (barrels then have a resistance of 25–100 $M\Omega$). It is important to prevent the diffusion of hydrogen ions from the electrode during normal recording or passage through nervous tissue, since hydrogen ion has an excitant action on neurones⁴. A 'backing' current of 5 nA appears adequate for this purpose and the presence

or absence of hydrochloric acid in the micropipette does not affect the excitability of cerebellar neurones. The efficacy of the lesioning can be judged by the degree of reduction in electrical activity at the recording site.

Tracks marked with lesions can readily be located for subsequent sectioning if they are made in the same plane as two capillary-glass microelectrodes placed at either end of the row of tracks. It is also possible to pass hydrogen ion continuously whilst withdrawing the micropipette, thus leaving a continuous lesion that appears in the section as a line, the thickness of which varies with current and rate of withdrawal. Although valuable for some purposes, use of such a line for correlation of histological structure with electrical records would involve relying on depth readings from the micromanipulator. The results obtained during this series of experiments have shown that these are frequently unreliable.

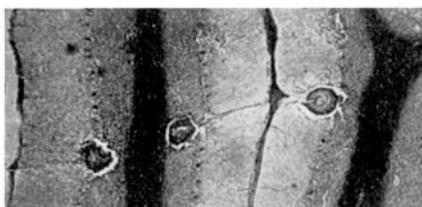


Fig. B. Three lesions in cat cerebellar cortex (tuber vermis); in Purkinje cell layer, granule cell layer and molecular layer (near a Purkinje cell layer). Strength and duration of electrophoretic currents: 7 μ A \times 15 sec, 4 μ A \times 10 sec and 16 μ A \times 10 sec. Stained with Luxol Fast Blue and Neutral Red.

Résumé. Des lésions pratiquées dans le tissu nerveux permettent de localiser histologiquement les régions explorées au moyen de microélectrodes. Des lésions de 50 μ ou plus peuvent être faites par des ions d'hydrogène introduits par iontophorèse avec une micropipette dont un des tubes contient de l'acide chlorhydrique. Les auteurs ont opéré sur l'écorce cérébrale et le cervelet du chat.

I. McCANCE and J. W. PHILLIS

Department of Physiology, Monash University, Clayton (Victoria, Australia), May 19, 1964.

⁴ D. R. CURTIS, J. W. PHILLIS, and J. C. WATKINS, *J. Physiol.* **158**, 296 (1961).

Zur Methodik der elektrophoretischen Untersuchung der Proteine der Speicheldrüsensekrete

Die organischen Bestandteile des menschlichen Speichels können mit chemischen Methoden bestimmt werden^{1–3}, daneben kann ihre Trennung auch durch Elektrophorese erfolgen^{4–12}. Zur Durchführung dieser Methode muss das Versuchsgut angereichert werden.

Bei 27 gesunden Versuchspersonen haben wir die 4 grossen Speicheldrüsen mit PVC-Röhrchen direkt sondiert. Nach Einführung der Sonden wurde zunächst 10 min gewartet, um den mechanischen Reiz der Sondierung abklingen zu lassen. Danach wurde der austretende Speichel als Ruhespeichel aufgefangen. Nach 45 bis höchstens 120 min waren 6 cm³ erreicht. Dann wurde die Speichelsekretion durch Lutschen frischer Zitronenscheiben stimuliert. Unter diesem alimentären Reiz betrug die Speichelsekretion etwa 1 cm³ pro Drüse und Minute. Der aufgefangene Speichel wurde als Zitronenspeichel bezeichnet. Anschliessend wurden zur Dämpfung des Parasympathikus 0,5 mg Atropin pro 70 kg Körpergewicht subkutan injiziert. 15 min nach der Injektion wurde der austretende Speichel als Atropinspeichel aufgefangen. Nach 35 bis 110 min waren etwa 6 cm³ erreicht. Danach wurde wiederum mit Zitrone stimuliert und der austretende Speichel als Atropin-Zitronenspeichel bezeich-

net. Der unter diesen Bedingungen gewonnene Speichel ist bei allen Versuchspersonen relativ gleichmässig¹³. In manchen Fällen wurde anschliessend noch 1 Ampulle Prostigmin (R) i. m. injiziert.

Die unmittelbare elektrophoretische Untersuchung der einzelnen Speichelproben erbrachte keine einwandfreien Ergebnisse. Vor allem liessen die Zitronen-Speichelproben

- ¹ H. MATHIS, *Z. Stomat.* **32**, 1188 (1934).
- ² M. DEAKINS, *J. dent. Res.* **20**, 129, 161 (1941).
- ³ M. DECHAUME, *Odontologie* **34**, 3 (1946).
- ⁴ A. THORN und K. KRIERSLEY, *Yale J. Biol. Med.* **26**, 3 (1953).
- ⁵ A. KÖSTLIN und S. RAUCH, *Helv. med. Acta* **24**, 164 (1957).
- ⁶ J. ZIPKIN, E. R. ADAMK und H. A. SAROFF, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **95**, 69 (1957).
- ⁷ J. H. GELLER, L. HAMES und G. H. ROVRELLSTAD, *J. dent. Res.* **38**, 854 (1959).
- ⁸ K. B. BJÖRNESJÖ, *Scand. J. clin. lab. Invest.* **7**, 159, 353 (1955).
- ⁹ M. MACHEBOUF, J. M. DUBERT und P. REBEYROT, *Bull. Soc. Chim. biol.* **35**, 346 (1951).
- ¹⁰ M. G. WOLDRING, *J. dent. Res.* **34**, 248 (1955).
- ¹¹ A. KRÖNCKE, *Papierchromatische Untersuchungen* (J. A. Barth, Leipzig 1959).
- ¹² J. KOTHE, *Dtsch. zahnärztl. Z.* **16**, 199 (1961).
- ¹³ W. SCHILLI, G. OCHS und J. ESCHLER, *Z. ges. exp. Med.*, im Druck (1964).

keine Banden erkennen. Der Speichel war zu dünnflüssig, die Konzentration der Proteine zu gering. Es wurden deshalb die Proteine durch Einengung angereichert, um eindeutige Fraktionen zu erhalten. Wir wandten verschiedene Einengungsmethoden an, um die für die elektrophoretische Untersuchung zweckmässigste Methode zu bestimmen. Alle gewonnenen Speichelproben wurden durch die folgenden Anreicherungsverfahren auf den 10. Teil ihres Ausgangsvolumens reduziert.

Als Einengungsmethoden wurden angewandt: (1) die Vakuumexsikkation; (2) die hochtourige Zentrifugation über 20 min bei 24000 g pro min. Die unterste Fraktion wurde abgesaugt und der Elektrophorese zugeführt; (3) die Entfernung des überflüssigen Wassers durch Zusatz von Polyvinylpyrrolidon¹⁴ im Exsikkator; (4) die Unterdruckdialyse mit Kollodiumhülsen im Pufferbad (Veronalpuffer mit pH 8,2); (5) die Dialyse 12 h lang in normalen Zellophan-Dialysierschläuchen gegen Veronalpuffer mit anschliessender Vakuumexsikkation.

Zur Ausschaltung von Störionen wurde vor der Exsikkation mit einem Serdolit-Mischionenaustauscher das Versuchsgut voll entzalzt. Vor dem Auftragen auf die Elektrophoresestreifen wurden sämtliche Proben im Veronalpuffer (pH 8,2) aufgenommen. Als Elektrophoresepapier wurde Schleicher & Schüll Nr. 2043 A mgl bzw. 470 mgl benutzt. Die Laufzeit betrug 12 h bei 70 V. Die

gemessene Stromstärke betrug 20 mA. Als Lösungsmittel diente Veronalpuffer (pH 8,2, Ionenstärke 0,075). Die Auftragsmenge betrug je nach Bestimmung 0,06 bis 0,006 ml. Um die gewanderten Substanzen genauer identifizieren zu können, wurden von jeder Probe 4 Streifen angelegt. Insgesamt wurden 155 Speichelproben untersucht. Die Färbung erfolgte mit Bromphenolblau oder Amidoschwarz, die Auswertung im Zeiss-Extinktionschreiber, teilweise im Beckmann-Integralschreiber.

Die elektrophoretische Darstellung der Proteinfraktionen war sehr unterschiedlich. Die durch Vakuumexsikkation angereicherten Sekrete waren hoch viskös, sie liessen sich schlecht weiterverarbeiten. Dennoch konnten mehrere deutlich sichtbare Banden erhalten werden (Figur 1). Mit der hochtourigen Zentrifugation konnten keine aufgegliederten Banden erzielt werden (Figur 2). Ebenso gelang es nicht, durch Einengung mit Polyvinylpyrrolidon die einzelnen Proteinfraktionen eindeutig zu

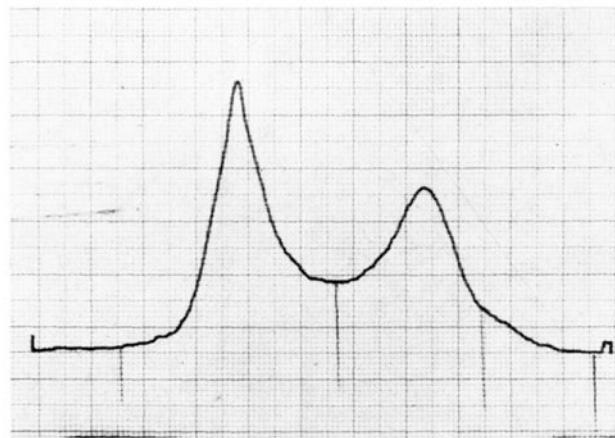


Fig. 1. Parotisspeichel, der durch Vakuumexsikkation eingedickt wurde.

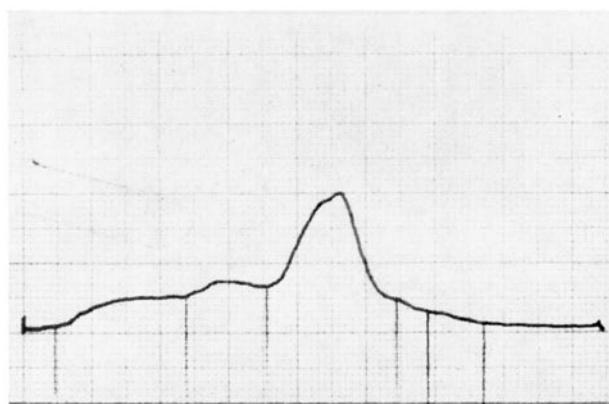


Fig. 3. Extinktionskurven eines Elektrophoresestreifens von Parotisspeichel der gleichen Patientin wie Figur 1 und 2, der mit Luviskol eingedickt wurde. Bromphenolblaufärbung.

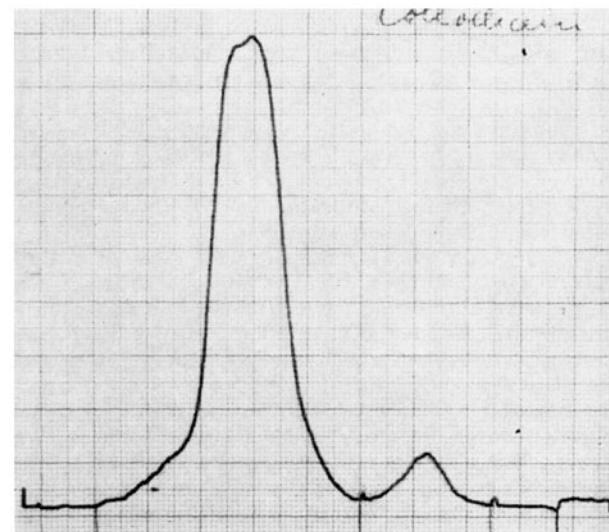


Fig. 4. Parotisspeichel der gleichen Patientin wie Figur 1 und 2. Eindickung durch Unterdruckdialyse mit Kollodiumschlauch.



Fig. 2. Extinktionskurven eines Elektrophoresestreifens von Parotisspeichel, der zentrifugiert wurde. Bromphenolblaufärbung.

¹⁴ J. STEGER, Münch. med. Wschr. 96, 747 (1954).

trennen. Die gewanderten Substanzmengen waren zu gering, um einwandfrei färbbare Banden zu erhalten (Figur 3). Die besten Ergebnisse erzielten wir bei der Unterdruckdialyse mit Kollodiumschlauch und bei der Dialyse im Zellophanschlauch gegen Veronalpuffer mit anschliessender Exsikkation (Figur 4 und 5). Dabei ließen sich 3 bis 5 Gesamtfraktionen unterscheiden. Mit Amidoschwarz¹⁵ traten die Banden intensiver und schärfer abgesetzt hervor als bei der Färbung mit Bromphenolblau¹⁶ (Figur 6 und 7).

Die Gegenüberstellung der im Speichelektropherogramm gewanderten Proteine mit den unter gleichen Bedingungen entstandenen Banden der Serumproteine zeigt, dass die Fraktionen vergleichbar sind. Die erste Fraktion beim Speichelektropherogramm ist im allgemeinen die stärkste, hat die gleiche Wanderungsgegeschwindigkeit wie die Serumalbumine. Die folgenden Fraktionen lassen sich wie die Serumglobuline in α -, β - und

γ -Anteile aufschlüsseln. Die gewonnenen Elektropherogramme zeigen bei den unter verschiedenen Bedingungen gewonnenen Speichelsekretproben selbst innerhalb der gleichen Versuchsserie stark unterschiedliche Werte. Die Menge und das Verhältnis der einzelnen Fraktionen zueinander schwanken stark. Lediglich von den Atropin-Zitronespeichelsekreten erhielten wir annähernd kongruente Bilder.

Um einen ungefähren Anhalt über den absoluten Gehalt an Proteinen zu gewinnen, führten wir beim Standardspeichel (Atropin-Zitrone) die Bestimmung des Gesamtstickstoffs mit der Mikro-Kjeldahl-Methode durch¹⁷. Die dabei erhaltenen Werte waren für die Parotis 31,3 mg% bei einer Streubreite von $\pm 4,5\%$. Die Werte der Submandibularis lagen bei 36,2 mg% bei einer Streubreite von $\pm 4,2\%$. Es wurden jeweils 10 Proben bestimmt.

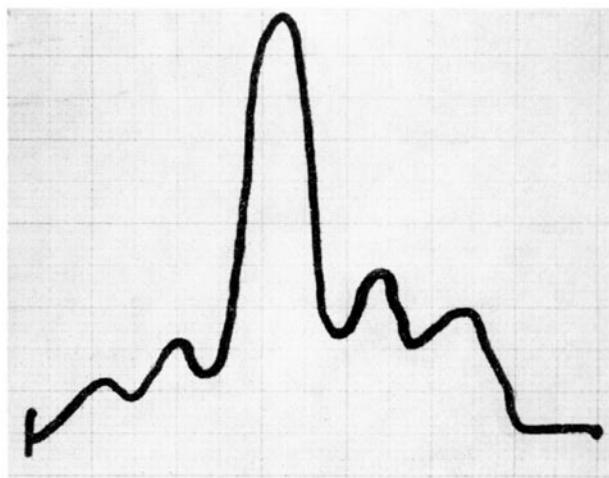


Fig. 5. Extinktionskurve von Submaxillarispeichel, der durch normale Dialyse gegen Veronalpuffer mit anschliessender Exsikkation gewonnen wurde.

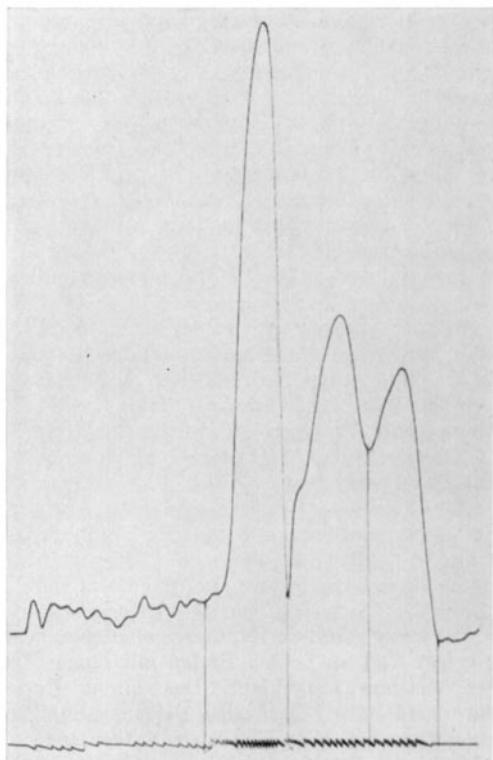


Fig. 7. Speichel wie Figur 6, Färbung mit Amidoschwarz.

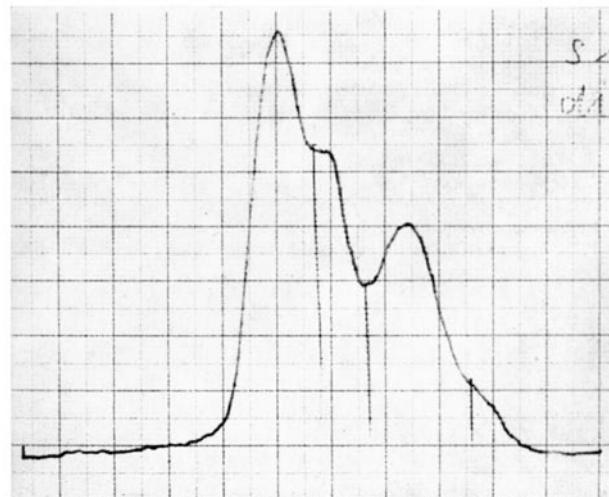


Fig. 6. Extinktionskurve von Submaxillarispeichel, der nach vorhergehender Dialyse im Zellophanschlauch durch Vakuumexsikkation eingeeignet wurde. Bromphenolblaufärbung. (Gleicher Speichel wie Figur 5.)

Summary. Several methods have been studied for concentrating the human saliva in order to get reliable electrophoresis patterns. The best method is a dialysis in a cellophane tube against veronal buffer (pH 8.2) followed by vacuum exsiccation.

J. ESCHLER, G. OCHS und W. SCHILLI

Abteilung für Kieferchirurgie und Kieferorthopädie,
Universitäts-Zahn- und Kieferklinik, Freiburg i. Br.
(Deutschland), 12. August 1964.

¹⁵ H. GRASSMANN und G. HANNIG, Z. physiol. Chem. 390, 1 (1952).

¹⁶ H. JENCKS, Biochem. J. 60, 205 (1955).

¹⁷ H. PREGL, *Die Ultramikroanalyse* (Springer-Verlag, Wien 1949).