

Myocardial lesions in the rats A-K of the groups I-IV

Group	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K	Mean	S.E.	Statistical significance
I, Diphtheria toxin (250 MLD/150 g)	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0.4	0.16	
II, Irradiation	1	1	1	0	1	1	1	0	2	2	1.0	0.20	0.02 < P < 0.05
III, Irradiation and diphtheria toxin (250 MLD/150 g)	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	1.4	0.16	P < 0.001
IV, Diphtheria toxin (1000 MLD/100 g)	1	1	3	2	3	2	3	2	3	1	2.1	0.28	P < 0.001

diphtherial toxin upon the myocardium. It is further shown that continuous irradiation, which was previously administered, sensitizes the cardiac tissue for incidence of these miliary fibre necroses, which can, under such conditions, be elicited by much smaller doses of diphtherial toxin. The non-specificity of these lesions is further documented by the observation of ZHDANOV⁹, who has established the miliary fuchsinophilic fibre necroses in cases of hypertensive disease, regardless of the degree of coronary atherosclerosis¹⁰.

Zusammenfassung. Grosse Gaben von Diphtherietoxin ohne vorhergehende chronische γ -Strahlung rufen vielfache kleine fuchsinophile Nekrosen in den Fasern des Myocards hervor. Eine solche chronische γ -Strahlung sensibilisiert das Myocard gegen das Auftreten von Nekrosen vom selben Typus. Dabei erweisen sich kleine Dosen von Diphtherietoxin als pathogen völlig ausreichend, indem

sie kleine Brennpunkte der Schädigung bilden und Herde infarktoider Nekrosen verschieden Ausmasses.

J. VAŠKŮ, E. URBÁNEK,
S. DOLEŽEL, and M. PRASLÍČKA

Institute of Pathological Physiology, Medical Faculty,
University of Jan Ev. Purkinje, Brno and Institute of
General Biology, Faculty of Natural Sciences,
Safárik University, Košice (Czechoslovakia),
July 8, 1965.

⁹ V. S. ZHDANOV, *Arterial Hypertension*. The Collection of Works, 15th Scientific Session of the Institute of Therapy, Academy of Medical Sciences USSR (January 23-24, 1964).

¹⁰ The authors wish to express their sincere thanks to Mrs. V. HADERKOVÁ, A. PEKÁRKOVÁ, and H. URBÁNKOVÁ for their excellent technical assistance.

Caractérisation de la β -galactosidase d'*Helix pomatia* par immunoélectrophorèse

Le suc digestif d'*Helix pomatia* possède une importante activité hydrolysante à l'égard du lactose et des galactosides synthétiques¹. Il semblait donc intéressant de lui appliquer la méthode de caractérisation des enzymes par des réactions spécifiques après immunoélectrophorèse, afin de dénombrer et de caractériser les protéines responsables de cette action.

Dans une expérience préliminaire, le suc digestif est soumis à une électrophorèse à pH 8,6 sur cellogel (tampon vénoral sodique, $\mu = 0,05$, 90 min, 20 V/cm, + 4°C). La bande est ensuite partagée longitudinalement: une moitié est colorée par l'amido-schwartz (Figure 1), l'autre est découpée en segments de 5 mm de largeur. Après élution de chaque segment, l'activité hydrolytique sur le *o*-nitrophénol- β -D-galactoside (ONPG) est dosée selon la technique de CONCHIE et al.². Si la complexité protéique du suc entraîne une mauvaise résolution électrophorétique, l'activité enzymatique se répartit cependant en trois pics distincts: l'un migre sensiblement comme les γ -globulines du sérum, un second plus élevé au niveau des α_2 -globulines et un troisième très faible, de migration plus rapide (Figure 1).

L'ONPG ne peut être utilisé pour la caractérisation après immunoélectrophorèse, car le nitrophénol libéré après hydrolyse est soluble et diffuse rapidement à travers la gélose.

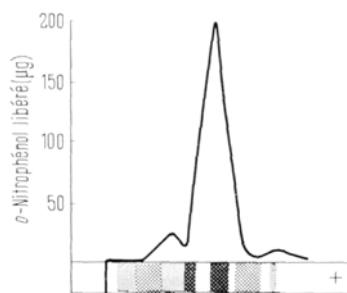


Fig. 1. Electrophoresis on cellulose acetate (pH 8.6) of suc digestif d'*Helix pomatia*. Révélation des protéines par l'amido-schwartz et courbe de répartition de l'activité sur l'ONPG après électrophorèse.

¹ R. GOT, A. MARNAY, P. JARRIGE et J. FONT, Nature 204, 686 (1964).

² J. CONCHIE, J. FINDLAY et G. A. LEVY, Biochem. J. 71, 319 (1959).

Au contraire, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside³ est un substrat chromogénique: incolore en solution, il donne, après action d'une galactosidase, un produit de réaction insoluble et coloré en bleu turquoise. Ce substrat a été utilisé par PEARSON et al.⁴ pour localiser la galactosidase dans les tissus.

Un immunosérum de lapin anti-suc digestif d'*Helix pomatia* est obtenu par la méthode suivante: la première semaine, deux injections de suc dilué au 1/20 (environ 10 mg d'azote/ml) avec adjuvant de Freund, puis, pendant trois semaines, une injection intramusculaire de la même quantité du suc, alternativement dans la cuisse droite et dans la cuisse gauche, quinze jours de repos puis reprise des injections intra-musculaires alternées pendant deux semaines.

La technique d'immunoélectrophorèse utilisée est celle de SCHEIDEGGER⁵. Une quinzaine de lignes de précipitations apparaissent avec le suc total (Figure 2a). Pour la caractérisation de l'enzyme, une solution du substrat chromogénique (0,00016 M dans le tampon acétate 0,1 M pH 5,3, 0,001 M en chlorhydrate de spermidine) est déposée dans la rigole des lames d'immunoélectrophorèse lavées préalablement durant deux jours après la réaction

immunologique. La réaction enzymatique s'effectue en chambre humide pendant 6 h à 37°C: deux arcs sont ainsi colorés spécifiquement en bleu turquoise, l'un dans la région des γ -globulines, l'autre au niveau des α_2 -globulines (Figure 2c). Par leur migration électrophorétique, ces deux lignes correspondent donc aux deux principales zones d'activité enzymatique mises en évidence sur cellogel.

On peut en conclure qu'il existe au moins deux β -galactosidases dans le suc digestif d'*Helix pomatia*, toutes les deux antigéniques, différant par leur mobilité électrophorétique.

L'activité hydrolytique du suc sur l'ONPG passe par un maximum à pH 5,3: des essais de dosage effectués à d'autres pH sur les zones séparées sur cellogel n'ont pas permis de différencier les galactosidases par leur pH optimum.

Un travail de purification de ces enzymes est en cours et permettra, sans doute, de mieux caractériser ces différents enzymes⁶.

Summary. Digestive juice of *Helix pomatia* was studied by immuno-electrophoresis: after incubation with a chromogenic substrate, 5-bromo-4-chloroindol-3-yl- β -D-galactopyranoside, two β -galactosidases were revealed.

R. GOT, A. MARNAY
et P. JARRIGE

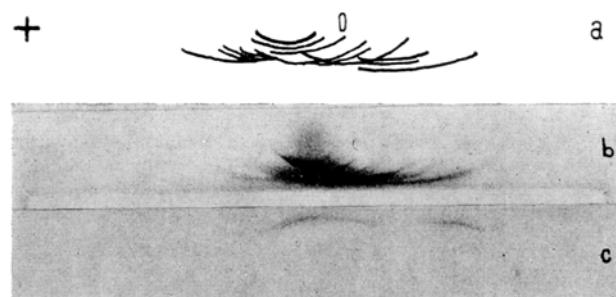


Fig. 2. Immunoélectrophorèse du suc digestif d'*Helix pomatia*. a, b, Schéma et photographie des lignes de précipitation révélées par l'amidoschwarz. c, Réaction spécifique des arcs de précipitation possédant une activité hydrolytique sur le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside.

³ J. P. HORWITZ, J. CHUA, R. J. CURBY, A. J. THOMSON, M. A. DAROOGH, B. E. FISHER, J. MAURICIO et I. KLUNDT, J. med. Chem. 7, 574 (1964).

⁴ B. PEARSON, P. L. WOLF et J. VASQUEZ, Lab. Invest. 12, 1249 (1963).

⁵ J. I. SCHEIDEGGER, Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 7, 103 (1955).

⁶ Remerciements: Les auteurs tiennent à exprimer leurs remerciements au Dr. J. P. HORWITZ qui leur a aimablement fourni le substrat chromogénique.

Effect of Mephenesin on Skeletal Muscle Myofibrils

Mephenesin, 3-(2'-methylphenoxy)propane-1,2-diol, has been classified as a skeletal muscle relaxant or depressant¹. It acts primarily on the spinal cord through inhibitions of polysynaptic pathways and more specifically on the internuncial cells². In the past, the pharmacological research with this drug has been directed toward its primary target, the spinal cord^{3,4}. Except for some studies regarding the action potential⁵, the pharmacodynamic effect of mephenesin on muscle has received little attention.

In some early work, BATE-SMITH and BENDALL⁶ found that mephenesin administration resulted in a marked delay in the onset of rigor mortis in muscle. More recently, SINK et al.⁷ showed that the sarcomere length in the muscle myofibril was highly correlated with the length

of this delay in the onset of rigor. From these researches, it should follow that the administration of mephenesin, by delaying the onset of rigor mortis, should produce sarcomeres that are longer than those normally observed in the post-rigor muscle myofibril. Consequently, the pur-

¹ A. GOT, *Medical Pharmacology* (C. V. Mosby Co., St. Louis 1964).

² E. HENNEMAN and J. SCHERRER, J. Pharmacol. exp. Therap. 97, 342 (1949).

³ F. M. BERGER, J. Pharmacol. exp. Therap. 96, 243 (1949).

⁴ D. GROB, Ann. Rev. Pharmacol. 1, 239 (1961).

⁵ C. R. STEPHEN and J. CHANDY, Canad. Med. Assoc. J. 57, 463 (1947).

⁶ E. C. BATE-SMITH and J. R. BENDALL, J. Physiol. 107, 2P (1948).

⁷ J. D. SINK, R. G. CASSENS, W. G. HOEKSTRA, and E. J. BRISKEY, Biochim. biophys. Acta 102, 309 (1965).