

2-deoxy sugars⁷. After the separation of the mixed α -components from the higher molecular weight β - and γ -polymers by filtration through Bio-gel P-300 resin⁸, the α_1 -, α_2 -, and α_3 -chains were isolated by free flow electrophoresis in 6M urea at pH 5.25 at 4°C⁹, using the apparatus described by HANNIG⁸. The homogeneity of the α -fractions was assayed by polyacrylamide gel electrophoresis⁹ at 10°C in 6M urea¹⁰, CM-cellulose chromatography¹¹, and by amino acid analyses.

Aliquot portions of the 3 α -chains which had been de-salted by filtration through Bio-gel P-10 resin were reacted with anthrone¹² and the absorption spectrum measured between 460 nm and 700 nm. The hexose content was computed on the basis of the extinction coefficient measured at 625 nm using glucose as a standard. A sample containing all the reagents, but no protein, and one containing protein and sulphuric acid but no anthrone reagent, gave no reaction measured at 625 nm.

The hexose content of the 3 α -chains, expressed as moles hexose/1000 amino acid residues, calculated by analyses of known volume-aliquots of gelatin for both hexoses and amino acids, and by analyses of hexose and amino acids on known weights, is 3.9 for α_1 -, 2.5 for α_2 -, and 4.3 for α_3 -chains. The moles of hexose/collagen macromol computed on the basis of a molecular weight of 320,000 and an average residue weight of 92⁴ is approximately 12 moles of hexose/collagen mol. The absorption spectrum of the 3 α -chains after reaction with anthrone gave a single symmetrical peak with a maximum at 625 nm, similar to glucose, and showed no other peaks. Furthermore, no 2-deoxy sugars⁷ and no hexosamines could be detected colorimetrically¹³, and no hexosamine peaks were seen in the chromatographs of large samples obtained on the automatic amino acid analyzer. It seems likely, therefore, that the anthrone-reacting substances were hexoses.

The content of hexoses has been calculated using glucose as a standard, whereas both glucose and galactose, which have different extinction coefficients after reaction with anthrone, have been identified in ichthyocol⁴. Therefore a direct comparison between the values reported in the present study and those obtained by BLUMENFELD et al.⁴ for ichthyocol is not entirely valid, since the distribution of hexoses may be different for different tissues.

Nonetheless, based on the anthrone reaction, the hexose content of ichthyocol/collagen macromol (~ 9 moles hexose/mol collagen)⁴ and of chicken-bone collagen (~ 12 moles hexose/collagen macromol) are similar. Moreover, from the present study it may be concluded that hexoses are an integral component of the single-stranded α -chains of at least one collagen¹⁴.

Résumé. Les 3 chaînes α du collagène de l'os de poulet ont été isolées en combinant les techniques de filtration sur gel et d'électrophorèse en veine libre. Des substances donnant une réaction d'anthrone positive, avec spectre d'absorption caractéristique des hexoses, ont été mises en évidence dans ces 3 chaînes. En utilisant le glucose comme standard, la détermination des hexoses fournit une valeur de 12 moles d'hexoses par molécule de collagène.

C. J. FRANÇOIS and M. J. GLIMCHER

Department of Orthopedic Surgery, Harvard Medical School and the Massachusetts General Hospital, Boston (Massachusetts, USA), August 2, 1966.

⁷ W. SCHNEIDER, in *Methods in Enzymology*, (Ed. S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN; Academic Press Inc., New York 1957), vol. 3, p. 680.

⁸ K. HANNIG, Z. analyt. Chem. 187, 244 (1961).

⁹ Y. NAGAI, J. GROSS, and K. A. PIEZ, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 494 (1964).

¹⁰ C. J. FRANÇOIS and M. J. GLIMCHER, Biochim. Biophys. Acta 97, 2 (1965).

¹¹ K. A. PIEZ, E. A. EIGNER, and M. S. LEWIS, Biochemistry, N.Y. 2, 58 (1963).

¹² T. A. SCOTT JR. and E. H. MELVIN, Analyt. Chem. 215, 555 (1955).

¹³ J. W. ROSEVEOR and E. L. SMITH, J. biol. Chem. 236, 425 (1961).

¹⁴ We thank Miss DIANE BRICKLEY and Mrs. CYLA SILBER for their technical assistance. This work was supported by grants from the U.S. Public Health Service, National Institutes of Health (AM-06375) and the John A. Hartford Foundation Inc. C. J. FRANÇOIS is a Fellow of the Helen Hay Whitney Foundation, on leave of absence from the Institut Interuniversitaire des Sciences Nucléaires de Belgique.

Einfluss des Licht-Dunkel-Wechsels auf den O₂-Umsatz der Rattenleber

In einer früheren Arbeit haben KIKUCHI und WEIHE¹ über eine Tagesperiodik des Sauerstoffverbrauchs der Leber von Sprague-Dawley-Ratten berichtet, die in bezug auf die möglichen tageszeitlichen Schwankungen der verschiedenen Funktionen der Leber und der Wärmeproduktion wichtig ist. Jetzt wurde die Tagesperiodik des O₂-Umsatzes der Leber bei Wistar Ratten bei normalem und umgekehrtem Kunsttag untersucht.

Material und Methoden. Männliche Wistar-Ratten wurden verwendet, die beim Töten zur Untersuchung 60–70 Tage alt waren. Die Tiere wurden in einer künstlichen Klimakammer, Raumtemperatur $24 \pm 0,25^\circ\text{C}$, RF 60 $\pm 3\%$, gehalten. Sie erhielten Wasser und Standardfutter (CE-2, Japan CLEA Co.) ad libitum. Bei normalem Kunsttag war die Lichtzeit von 07.00 bis 19.00 h und bei umgekehrtem Kunsttag von 19.00 bis 07.00 h. Die Licht-

intensität über dem Käfig war 50–60 Lux. Bei jedem Versuch wurden die Tiere um 07.30 h, 14.00 h und 17.00 h im leichten Ätherrausch durch Ausbluten aus der Bauchorta getötet. Schneiden der Leber, Schnittdicke ca. 0,5 mm, war nach DEUTSCH²; Messung des O₂-Verbrauchs nach der Warburg-Methode; Medium: Krebs-Ringer-Phosphatlösung, pH 7,3; Gasphase: 100% O₂; Wasserbadtemperatur: 37,5°C. Das Glykogen der Leber wurde nach der Anthron-Methode³ und Stickstoffgehalt der Leber nach Mikro-Kjeldahl bestimmt.

Zu jedem Versuchszeitpunkt wurden 8–12 Tiere untersucht. Zur O₂-Messung wurden von jeder Leber Doppelbestimmungen vorgenommen.

¹ M. KIKUCHI und W. H. WEIHE, Experientia 20, 706 (1964).

² W. DEUTSCH, J. Physiol. 87, 56 P (1936).

³ J. VAN DER VIES, Biochem. J. 57, 410 (1954).

Ergebnis. Unter dem normalen Wechsel von Licht- und Dunkelzeit (Kunsttag: 07.00–19.00 h), nach dem einwöchigen Aufenthalt in der Klimakammer, zeigte der Verlauf des O_2 -Verbrauchs der Leberschnitte von Wistar-Ratten die gleiche Kurve wie sie bei Sprague-Dawley-Ratten gefunden wurde. Der Q_{O_2} pro mg Trockengewicht war $6,83 \pm 0,08$ am Morgen, $8,07 \pm 0,15$ am Mittag und $8,76 \pm 0,19$ am Abend. Die Signifikanz der Differenz zwischen den Messzeiten war $p < 0,01$ (Figur 1a). Wenn O_2 -Verbrauch auf N-Gehalt der Leber bezogen wird, waren die Werte der Reihe nach $48,36 \pm 0,97$, $54,30 \pm 2,12$ und $54,91 \pm 1,25$; dabei ergab sich eine Signifikanz von $p < 0,001$ zwischen Morgen und Abend (Figur 1b). Der tageszeitliche Verlauf des Glykogengehaltes der Leber, der gleichzeitig mit Q_{O_2} gemessen

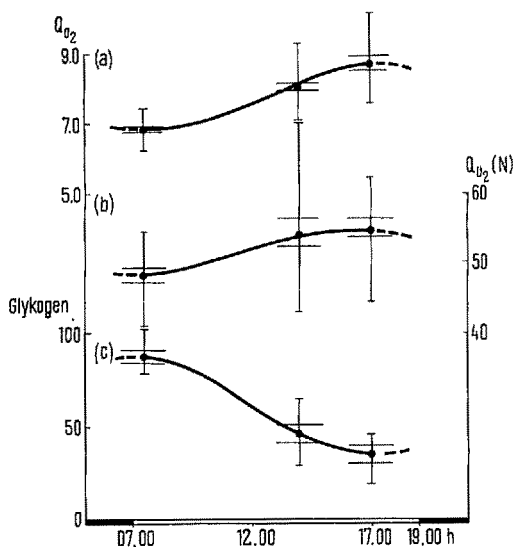


Fig. 1. Normaler Kunsttag. Mittelwert mit S.E. und Extrembereich. Abszisse: Tageszeit, Lichtzeit hell und Dunkelzeit schwarz. (a) Q_{O_2} , $\text{mm}^3 O_2/\text{mg}$ Trockengewicht/h. (b) $Q_{O_2}(N)$, $\text{mm}^3 O_2/\text{mg N/h}$, Ziffern auf der rechten Seite. (c) Glykogengehalt, mg Glykogen/g Feuchtgewicht.

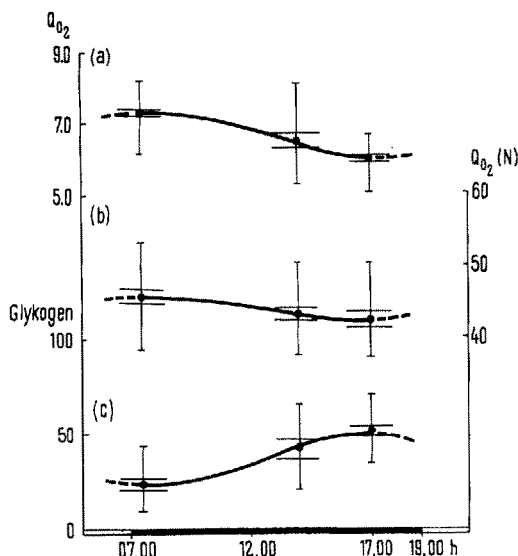


Fig. 2. Umgekehrter Kunsttag. (Legende siehe Figur 1.)

wurde, zeigte eine umgekehrte Kurve beim Vergleich mit der des O_2 -Verbrauchs, und zwar war der höchste Wert, $87,80 \pm 3,51$ mg/g, am Morgen und der tiefste Wert, $45,36 \pm 4,51$ mg/g, am Abend ($p < 0,001$) (Figur 1c).

Bei den Ratten, die ca. 1 Monat lang bei umgekehrtem Kunsttag gehalten waren, war der Verlauf von Q_{O_2} verschoben; morgens war der Wert am höchsten und sank bis zum tiefsten Wert am Abend ab. Die Werte waren $7,23 \pm 0,12$ (07.30 h), $6,56 \pm 0,18$ (14.00 h) und $5,97 \pm 0,10$ (19.00 h). Die Signifikanz war zwischen 7.30 h und 14.00 h $p < 0,005$, zwischen 07.30 h und 19.00 h $p < 0,001$ (Figur 2a).

Die Kurve des O_2 -Verbrauchs pro mg N zeigte eine im wesentlichen gleiche Phasenverschiebung. Die Werte betrugen $45,99 \pm 0,96$, $43,68 \pm 0,72$ und $42,65 \pm 0,94$, dabei war die Signifikanz zwischen Morgen und Abend $p < 0,025$ (Figur 2b).

Der tageszeitliche Verlauf des Glykogengehaltes der Leber war ebenfalls umgekehrt. Die Werte waren der Reihe nach $23,63 \pm 3,16$, $42,29 \pm 4,77$ und $51,54 \pm 2,75$. Die Differenz zwischen Morgen und Mittag sowie zwischen Morgen und Abend war signifikant ($p < 0,005$ und $p < 0,001$) (Figur 2c).

Diskussion. Aus diesen Resultaten ergibt sich, dass bei beiden Stämmen, den Sprague-Dawley- und den Wistar-Ratten, die Tagesperiodik im Sauerstoffverbrauch der Leberschnitte vorhanden ist, und zwar mit niedrigen Werten am Morgen und hohen Werten am Abend.

Den Sauerstoffverbrauch der Leber und einiger anderer Organe während 24 h haben HOLMGREN und NAUMANN⁴ untersucht, ohne eine regelmässige Periodik zu finden. In einigen Punkten der Versuchsbedingungen unterscheidet sich die Arbeit von der unseren. Bei ihrer Untersuchung sind die Zeitpunkte der Messung 02.00, 08.00, 14.00 und 20.00 h; nach unserer Erfahrung läuft die Kurve nach dem tiefsten Punkt um 17.00–18.00 h schon um 20.00 h aufwärts. Im Bericht von HOLMGREN und NAUMANN ist der Tierstamm nicht angegeben.

Nach der ungefähr 30tägigen Akklimatisation an den umgekehrten Kunsttag war die Tagesperiodik von Q_{O_2} und diejenige des Leberglykogengehaltes umgekehrt von demjenigen bei normalem Licht-Dunkel-Wechsel. Aus dieser Erscheinung wird geschlossen, dass die genannte Periodik vom Licht-Dunkel-Wechsel abhängig ist.

Die Phasenlagen von Q_{O_2} und des Glykogengehaltes verliefen bei beiden Versuchsbedingungen in gegensätzlicher Richtung.

Summary. Similar diurnal periodicity in oxygen consumption of liver slices in Wistar rats was observed as that previously found in Sprague-Dawley rats. The rate of oxygen consumption was low in the morning and high in the evening. After inversion of lighting regimes, the phase shifted and reached the reversal curve in about 30 days. On the basis of these findings, it is estimated that diurnal periodicity in oxygen consumption of liver slices is influenced by alteration of the periods of light and darkness. Liver glycogen rhythm showed a reversed correlation to that of oxygen consumption in both lighting regimes.

M. KIKUCHI und A. HOSOMI

Institut für Hygiene, Juntendo Universität, Tokyo (Japan), 6. Juni 1966.

⁴ H. J. HOLMGREN und B. NAUMANN, Acta med. scand. 128, 326 (1947).