

Tension Transients in Glycerol-Extracted Fibres of Insect Fibrillar Muscle (*Lethocerus maximus*)¹

A quick stretch of living frog skeletal muscle produces a delayed increase in tension followed by oscillatory fluctuations of the isometric tension². Similar oscillations are observed after a sudden increase or decrease of the load on the muscle^{3,4}. The delayed rise in tension after quick stretch is most pronounced in living⁴ and glycerol-extracted⁵ insect fibrillar muscle. Here, the tension increase is associated with a tension-dependent^{6,7} increase in the activity of the actomyosin ATPase, suggesting that the contractile machinery may be turned on rather abruptly by applying a quick stretch. In the following we report experiments showing that after an abrupt stretch of glycerol extracted fibres the isometric tension does not at once attain a steady level; instead it fluctuates in an oscillatory fashion. These isometric oscillations are to be distinguished from the previously described auxotonic 'free oscillations' which are dependent on and correspond to the natural frequency of the recording lever system (see^{5,8}).

Giant tropical waterbugs (*Lethocerus maximus*) were kindly supplied by Dr. F. BENNETT (Trinidad). The dorsal longitudinal muscle was dissected and extracted with glycerol as described previously⁵. Bundles of about 6–8 fibres were cut to a length of 4 mm and glued to the shaft of an RCA 5734 force transducer and to the arm of a Goodman VP 47 vibrator, driven by a servo-loop amplifier, connected to a Hewlett-Packard 3300 A function generator. The length changes were monitored by FP 17 L 100 Siemens Fieldplates moving in and out of a magnetic field; length and tension signals were displayed on a 502 A Tectronix double beam oscilloscope.

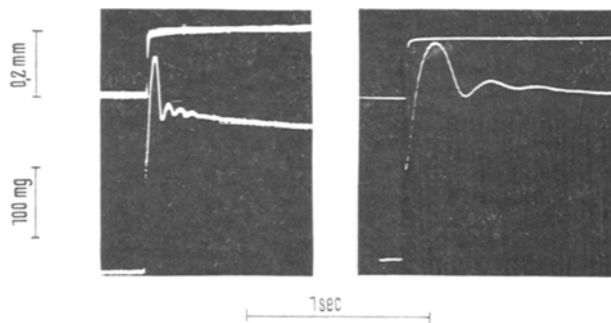
The incubation solution contained 30 mM KCl, 10 mM Na-azide, 10 mM ATP (Na-salt) and 0.8 mM AMP in equilibrium with 2 mM ADP, 10–30 units adenylate kinase/ml, 12 mM MgCl₂, 4 mM Ca-EGTA (*p*Ca ~5), 10 mM histidine pH 6.5 at the respective experimental temperature.

The Figure shows the effect of an abrupt stretch at 2 different temperatures. Note that a quick stretch is associated with an abrupt increase in tension which is followed by a further (delayed) rise in tension and by several oscillations of the isometric tension. The maximal tension in the first oscillatory cycle is about 40 dynes/fibre; it is similar at 25 °C and 15 °C, but often considerably larger than the steady tension attained after cessation of the isometric oscillations. At 25 °C the frequency of these oscillations is about 10–15 Hz, with a temperature coefficient (*Q*₁₀) of about 3–4 between 5 and 30 °C. The frequency is hardly affected by changes in *p*Ca or pH (in the range of 6.3–7) but it is greatly reduced by ADP. Similar oscillations were occasionally observed after a quick release of the tension. The content of crossbridges is about 3 *p* moles per centimetre fibre (cf.⁹) rather than 1.5 *p* moles (see¹⁰) and the rate of ATP-splitting of maximally activated fibres is up to 30 *p* moles/sec in 1 cm fibre, and at 25 °C (cf.¹¹) with a temperature coefficient of up to 4! In presence of ITP (20 mM, 10^{–6} M Ca⁺⁺, pH 6.5) the (delayed) rise in tension produced by quick extension is much slower than with ATP; no isometric oscillations were observed under these conditions.

It seems likely that the successful demonstration of isometric oscillations in the isolated contractile machinery results from a sudden maximal activation produced by maximal extension (Stretch activation!) at high concentrations of free calcium and at a low level of ADP which is kept as constant as possible within the fibre.

The occurrence of stretch induced oscillations points to the basic similarity of the contractile mechanism in frog sartorius (cf.¹²) and in glycerol-extracted insect

fibrillar muscle, and the findings reported are consistent with the following working hypothesis: (1) At the molecular level the maintained contractile tension is generated intermittently, possibly by the cycling of cross-bridges (cf.^{13,14}). (2) The oscillatory fluctuations of tension may reflect the periodic (cyclic) movement of crossbridges which may have been partly synchronized by 'stretch activation' as suggested in a recent hypothesis (see¹⁵). The transient tension presumably produced by synchronous strokes of bridges is greater than the tension during asynchronous activity. (3) The turnover-frequency of crossbridges is strongly dependent on temperature with a *Q*₁₀ of up to 4, as in the case of the ATP-splitting by the actomyosin ATPase (cf.¹⁶). (4) Maximally activated extracted fibres split about 1 molecule of ATP per crossbridge cycle during isometric contraction. (5) The frequency of crossbridge cycles (see¹⁴) corresponds to the frequency of optimal power output (see¹⁷) during driven oscillations, thus suggesting synchronization of



Transient response of contractile tension (below) after a quick stretch (above). Fibre bundle (8 fibres, 4 mm long) suspended in ATP-salt-solution; see methods. Temperature: 24 °C (left) and 14 °C (right).

¹ Supported by Grant No. RU 154/1 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

² C. F. ARMSTRONG, A. F. HUXLEY and F. J. JULIAN, *J. Physiol.* **186**, 26P (1966).

³ M. M. CIVIAN and R. J. PODOLSKY, *J. Physiol.* **184**, 511 (1966).

⁴ E. G. BOETTIGER, in *Physiology of Triggers* (Ed. T. H. BULLOCK; Am. Physiol. Soc., Washington, D.C. 1957), p. 103.

⁵ B. R. JEWELL and J. C. RÜEGG, *Proc. R. Soc. B* **164**, 428 (1966).

⁶ J. C. RÜEGG and R. T. TREGAR, *Proc. R. Soc. B* **165**, 497 (1966).

⁷ J. C. RÜEGG and H. STUMPF, *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **305**, 34 (1969).

⁸ J. C. RÜEGG, *Experientia* **24**, 529 (1968).

⁹ M. K. REEDY, *Am. Zoologist* **7**, 665 (1967).

¹⁰ R. A. CHAPLAIN and R. T. TREGAR, *J. molec. Biol.* **21**, 275 (1966).

¹¹ G. STEIGER, *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **307**, 104 (1969).

¹² F. J. JULIAN, *Biophys. J.* **9**, 547 (1969).

¹³ H. E. HUXLEY and W. BROWN, *J. molec. Biol.* **30**, 383 (1967).

¹⁴ M. K. REEDY, K. C. HOLMES and R. T. TREGAR, *Nature* **207**, 1267 (1965).

¹⁵ J. W. S. PRINGLE, *Progr. Biophys. molec. Biol.* **17**, 1 (1967).

¹⁶ M. BARANY, *J. gen. Physiol.* **50**, 197 (1967).

¹⁷ G. STEIGER and J. C. RÜEGG, *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **307**, 1 (1969).

¹⁸ J. W. S. PRINGLE, in *Aspects of Cell Motility* (Ed. P. L. MILLER, Cambridge University Press 1968), p. 67.

¹⁹ Acknowledgment. We are greatly indebted to Miss GUDRUN MÜLLER for her expert technical assistance.

bridges under these conditions (cf. PRINGLE's hypothesis^{18,19}).

Zusammenfassung. Mit Wasser-Glyzerin extrahierte fibrilläre Muskelfasern (Fasermodelle) von *Lethocerus maximus* zeigen im ATP-Bad nach plötzlicher Dehnung das Phänomen der Dehnungsaktivierung, gefolgt von einer gedämpften, temperaturabhängigen isometrischen Oszillation der Kontraktionsspannung. Die Frequenz ent-

spricht offenbar der Eigenfrequenz zyklisch tätiger «Kontraktionsbrücken» zwischen Aktin und Myosin.

M. SCHÄDLER, G. STEIGER
and J. C. RÜEGG

Department of Cell Physiology,
Ruhr-University of Bochum,
D-463 Bochum-Querenburg (Germany), 9 June 1969.

Déclenchement de la soif hyperosmolaire chez le rat et le mériion

Depuis les expériences de GILMAN¹, il est généralement admis que le stimulus déclenchant la soif est l'hyperosmolarité effective du liquide extracellulaire. Cette hyperosmolarité effective peut apparaître aussi bien par déshydratation de l'animal qu'à la suite de l'injection de solutions hyperosmotiques de solutés ioniques ou non ioniques, à condition que les membranes cellulaires ne leur soient pas librement perméables. On suppose généralement que des cellules osmométriques se rétrécissant en présence d'une hyperosmolarité extracellulaire effective sont situées dans le centre de la soif de l'hypothalamus latéral^{2,3}.

Les expériences rapportées ont été exécutées afin de préciser les rapports entre l'osmolarité plasmatique et la soif chez le rat et le mériion.

Des rats des 2 sexes pesant environ 300 g, entraînés à satisfaire leur besoin d'eau quotidien en 3 h, l'après-midi, consomment les 80% de leur prise totale au cours de la première heure. C'est à ce stade de satiété hydrique relativement constante que les animaux ont reçu des injections i.v. de 3 ml/rat de solutions 5 fois hyperosmotiques de NaCl, mannitol, fructose, urée et glucose. Leur consommation d'eau à la suite de ces injections a été mesurée à intervalles de 15 min pendant 2 h et comparée pour chaque animal à celle suivant l'injection d'une solution isotonique du même soluté. La différence a été appelée effet dipsigène de la solution hyperosmolaire. L'osmolarité plasmatique a été mesurée dans des expériences parallèles à intervalles réguliers par une microméthode cryoscopique utilisant 0,2 ml de sang prélevé à la patte. Le Tableau I indique l'effet dipsigène des différentes solutions hyperosmotiques; le Tableau II les changements de l'osmolarité plasmatique après injection de solutions hyperosmotiques de NaCl et de glucose.

Les résultats montrent que l'urée exerce un effet dipsigène plus grand que celui qui correspondrait à l'osmolarité effective qu'elle entraîne. Le glucose par contre, malgré une élévation de l'osmolarité plasmatique plus grande que celle provoquée par le NaCl, n'a pas d'effet dipsigène significatif dans les 30 min après l'injection et n'a qu'un faible effet dipsigène durant les 30 min suivantes. Si les récepteurs du centre de la soif étaient des osmomètres ils devraient être moins perméables à l'urée et plus perméables au glucose que presque toutes les autres cellules de l'organisme.

Des mériions (M. M. Shawii) qui ne boivent pas d'eau dans leur habitat naturel, dans des conditions de laboratoire, peuvent être entraînés à boire 8 à 10 ml d'eau par jour, et être entraînés à consommer toute cette quantité en une période restreinte de 3 à 24 h. Chez ces animaux l'injection de mannitol et de glucose hyperosmotiques provoque des signes de souffrance visibles mais n'entraîne aucune prise d'eau supplémentaire.

Tableau I. Effet dipsigène de différentes solutions 5 fois hyperosmotiques en 2 h exprimé en fonction du temps après injection

Solutés	Effet dipsigène μ l/rat par minute				ml/rat $\times$ 2 h
	1-15 min	15-30 min	30-60 min	60-120 min	
NaCl	275 $\pm$ 30°	60 $\pm$ 20 ^b	60 $\pm$ 15°	5 $\pm$ 5	6,8 $\pm$ 0,5°
Mannitol	189 $\pm$ 36°	82 $\pm$ 24 ^b	24 $\pm$ 5 ^b	8 $\pm$ 8	5,7 $\pm$ 0,72°
Urée	110 $\pm$ 23°	89 $\pm$ 17°	34 $\pm$ 11 ^b	10 $\pm$ 8	4,05 $\pm$ 0,9°
Fructose	162 $\pm$ 45 ^b	48 $\pm$ 27	11 $\pm$ 10	4 $\pm$ 4	3,6 $\pm$ 0,6°
Glucose	8 $\pm$ 2	18 $\pm$ 13	45 $\pm$ 10°	4 $\pm$ 5	1,1 $\pm$ 1,0

Différence entre la consommation d'eau durant plusieurs périodes après injections i.v. de solutions 5 $\times$ hypertoniques et isotoniques: 3 ml/rat. Valeurs moyennes de groupes de 10 à 20 rats $\pm$ 1 erreur moyenne de la moyenne. La signification statistique de ces différences est indiquée par ° $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$ et ° $p < 0,001$.

Tableau II. Evolution de l'osmolarité plasmatique (mOsm/L) après injection de 3 ml de NaCl et de glucose 5 fois hyperosmotiques

min après injection	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min
NaCl		+ 15 $\pm$ 3°	+ 21 $\pm$ 5 ^b	- 4,6 $\pm$ 1 ^a	- 8 $\pm$ 3 ^a
Glucose	+ 35 $\pm$ 8 ^b	+ 19 $\pm$ 9	+ 27 $\pm$ 3°	+ 16 $\pm$ 6 ^a	- 19 $\pm$ 6 ^a

Les valeurs sont les moyennes de groupes de 6 à 8 rats $\pm$ 1 erreur moyenne de la moyenne et représentant la différence entre les osmolarités après injection et immédiatement avant injection (311 $\pm$ 4 mOsm). La signification statistique de ces différences est indiquée par ° $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$ et ° $p < 0,001$.

Summary. Osmotic arousal of thirst was studied in rats by measuring additional water intake for 2 h after i.v. injection of hyperosmolar solutions. NaCl and Mannitol induced a rapid and large water intake; urea and fructose were half as effective; glucose was practically ineffective though it increased plasma osmolarity. In desert rats, hyperosmotic solutions did not induce any drinking.

LISETTE HAEFELI et G. PETERS

Université de Lausanne, Institut de Pharmacologie,
1005 Lausanne (Suisse), 29 mai 1969.

¹ A. GILMAN, Am. J. Physiol. 120, 323 (1937).

² B. ANDERSSON, Experientia 8, 157 (1952).

³ S. P. GROSSMAN, Science 132, 301 (1960).