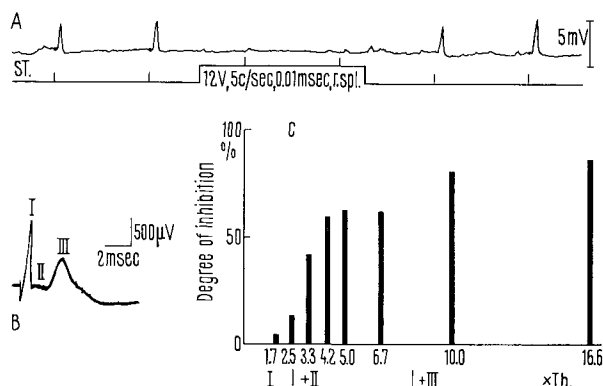


depressant effect thereafter increasing steeply with increasing magnitude of the second component. Further increase in depressant effect of the stimulation occurred in the realm of the stimulus intensity for the third component, however, the rate of increase was only slight in spite of the rapid augmentation of the amplitude of this third component. It can therefore be concluded that inhibition of GSR is due to activity carried in the fibers of the second component of the compound action potential. Mean value of the maximum conduction velocity of this component was 23 m/sec. Frequency characteristics of the splanchnic stimulation were investigated at frequencies: 0.3, 0.5, 1, 3, 5, 10, 50 and 100/sec, with stimulus intensity



(A) Amplitude of evoked GSR recorded from right paw of the anterior limb is depressed during splanchnic afferent stimulation. Stimulation-evoking GSR was applied to the common peroneal nerve at every 45 sec (signal on the baseline). The right splanchnic nerve was stimulated repetitively with rectangular pulses of 0.01 msec duration, 12 V intensity, at a rate of 5/sec, during the period shown by upward deflexion of the baseline. (B) Neurogram of the splanchnic nerve. 3 components are indicated by Roman numerals. The fourth component is not shown. (C) Relationship between degree of inhibition of the GSR (ordinate) and stimulation intensity expressed in multiples of the threshold of the first splanchnic component (TI) (abscissa). The right splanchnic nerve was stimulated at a rate of 5/sec, with rectangular pulses of 0.01 msec, for 90 sec; threshold for the first component (TI) was 1.2 V. Roman numerals at the bottom indicate the appearance of the respective component in the neurogram.

kept constant at a range of the second component. The inhibitory effect sets in at 0.5/sec; reaches a maximum at 5/sec or at 10/sec and decreases with further increase of the stimulation frequency.

Sympathetic reflex discharge elicited by splanchnic or somatic afferent stimulation was investigated intensively by PERL et al. and DOWMAN et al. Both of them reported marked depression of the sympathetic reflex discharge by prior conditioning of splanchnic or spinal afferent fibers<sup>2,3</sup>. The conduction velocity of these fibers lies between 15–35 m/sec<sup>2</sup>. DUDA<sup>4</sup> reported that the somatic polysynaptic reflex was inhibited by splanchnic afferent stimulation as well as by cutaneous afferent. In our preliminary experiment, it was found that GSR was inhibited by afferent fibers of the common peroneal nerve with maximum conduction velocity between 20 and 30 m/sec<sup>1</sup>. This value corresponds with that obtained on the splanchnic nerve reported here. These data mentioned above suggest that a common afferent system may operate in somatic and in visceral nerves to produce inhibition of a visceral and a somatic motor outflow. Further experiments are, however, still needed to clarify this problem<sup>5</sup>.

**Zusammenfassung.** Der hemmende Einfluss wiederholter elektrischer Reizung der Afferenzen des N. splanchnicus auf den galvanischen Hautreflex (GHR) wurde an Katzen untersucht. Gleichzeitige Registrierung des Neurogrammes des N. splanchnicus zeigt, dass die reflektorische Hemmung des GHR durch Fasern der A-δ Gruppe hervorgerufen wird.

T. KUMAZAWA and T. NAOTSUKA

Department of Physiology,  
Nagoya University School of Medicine,  
Nagoya (Japan), 28 July 1969.

<sup>2</sup> D. N. FRANZ, M. H. EVANS and E. R. PERL, *Am. J. Physiol.* 211, 1292 (1966).

<sup>3</sup> J. H. COOTE, C. B. B. DOWMAN and W. V. WEBER, *J. Physiol.* 202, 147 (1969).

<sup>4</sup> P. DUDA, *Physiologia bohemoslov.* 13, 137 (1964).

<sup>5</sup> The authors wish to thank Prof. K. TAKAGI, Nagoya University, for his encouragement throughout the experiment, and Dr. R. HUNSPERGER, Zurich University, for his revising this manuscript.

## Nachweis der Selbst-Erregung der circadianen Periodizität bei Carabiden (Coleoptera Ins.)\*

Carabiden zeigen eine starke Abhängigkeit ihrer tageszeitlichen Laufaktivität vom zeitgebenden Licht-Dunkel-Wechsel, wie besonders die extrem schnelle Resynchronisation nach Phasenumkehr des Zeitgebers und die Synchronisation durch 8/8-Std-Tage zeigen<sup>1</sup>. Es war aus diesen Gründen fraglich, ob die auch bei Carabiden im Konstantversuch auftretende Circadian-Periodik selbst-erregt (ungedämpft) ist oder lediglich ein gedämpftes Nachschwingen nach Erregung durch Aussenreize darstellt. Zur Entscheidung kann das Verhalten der Amplitude im Konstantversuch weniger gut herangezogen werden, da – im Falle der Fremd-Erregung – die Schwingung auch im Konstantversuch durch gelegentliche, aperiodische Reizveränderungen wieder aufgeschaukelt werden könnte. Hier soll zur Klärung der angeschnittenen Frage das Verhalten bei Zeitgebern verschiedener Frequenz herangezogen werden. Der Mitnahmebereich ist im

Falle der Selbst-Erregung beschränkt; ausserhalb seiner Grenzen setzt sich eine endogene Circadian-Periodizität durch. Fremd-erregt schwingende Systeme lassen sich hingegen von beliebigen Zeitgeberfrequenzen mitnehmen<sup>2</sup>.

Der Nachweis der Selbst-erregung, der an Einzelorganismen durchzuführen ist<sup>3</sup>, wurde auf diesem Wege bisher vor allem für Vertebraten erbracht, während bei Insekten positive Befunde für *Periplaneta* und *Leucophaea* (beide Blattodea) vorliegen<sup>3</sup>.

\* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

<sup>1</sup> H. U. THIELE und F. WEBER, *Oecologia*, Berlin 7, 315 (1968).

<sup>2</sup> R. WEBER, *Z. vergl. Physiol.* 57, 1 (1965).

<sup>3</sup> J. HARKER, *The Physiology of Diurnal Rhythms* (University Press, Cambridge 1964).

**Material und Methode.** Je 12 *Carabus cancellatus*-♂♂ wurden einzeln in 8/8-, 10/10- sowie 16/16-Std-Tagen gehalten. Ein Teil der Käfer war jeweils nicht oder nur sehr wenig aktiv und blieb unberücksichtigt. Vor oder nach einem jeden dieser 2–3-wöchigen Versuche wurden dieselben Tiere 6 bis 7 Tage lang im 12/12-Std-Tag untersucht. Die Helligkeit in den Lichtphasen betrug 2 oder 50 Lux, die in den Dunkelphasen 0 Lux. Die von den Aktographen ausgehenden Impulse wurden von Relais gezählt, deren Stand halbstündlich ausgedruckt wurde. Die auf Lochkarten übertragenen Messwerte wurden von der Rechenanlage der Universität Münster ausgewertet.

Üblicherweise wird die Periodenlänge an Hand eines korrespondierenden Punktes der einzelnen Perioden (zum Beispiel des Aktivitätseinsatzes) bestimmt, der jedoch nicht immer eindeutig festzulegen ist. Die hier angewendete Registriertechnik legt es nahe, bei der Bestimmung der Periodenlänge alle pro Zeiteinheit gemessenen Aktivitäten bezüglich ihrer Menge und zeitlichen Verteilung zu berücksichtigen. Das dafür vorgeschlagene Verfahren der Autokorrelation<sup>4</sup> lieferte für *C. cancellatus* Ergebnisse, die aus folgenden Gründen unbefriedigend waren: 1) die Extrema der Korrelationskoeffizienten traten nicht scharf genug hervor, so dass die Bestimmung der Periodenlänge eine gewisse Willkür einschloss; 2) auch dann, wenn offensichtlich keine Periodizität vorlag (etwa bei weitgehender Inaktivität der Versuchstiere), lieferte die Autokorrelation stark schwankende Korrelationskoeffizienten, die eine Bestimmung von Periodenlängen suggerierten. Diese Nachteile haften dem neu entwickelten Verfahren nicht an, das im Folgenden kurz dargestellt werden soll (eine eingehende Darstellung und Begründung soll an anderer Stelle erbracht werden). Die gemessenen Aktivitätswerte  $a_1, a_2, \dots, a_n$  werden in einem besonderen Schema (einer Matrix  $B$  von  $\tau$  Zeilen und  $p$  Spalten) spaltenweise angeordnet. Man errechnet die Streuung der Werte einer Zeile um den Zeilenmittelwert. Durch Wahl der Zeilenzahl  $\tau$  versucht man die Streuung im Mittel über alle Zeilen möglichst klein zu machen. Formelmässig führt das zu folgender Funktion von  $\tau$

$$\tilde{\varphi}(\tau) = \frac{\sum_{\lambda=1}^{\tau} \sqrt{\sum_{v=0}^{n_{\lambda,\tau}} (a_{v\tau+\lambda})^2 - \frac{1}{n_{\lambda,\tau}} \left( \sum_{v=0}^{n_{\lambda,\tau}} a_{v\tau+\lambda} \right)^2}}{\sum_{\lambda=1}^{\tau} \sqrt{\sum_{v=0}^{n_{\lambda,\tau}} (a_{v\tau+v})^2}}$$

mit  $n_{\lambda,\tau}$  so, dass

$$n_{\lambda,\tau} \cdot \tau + \lambda \leq N < (n_{\lambda,\tau} + 1) \cdot \tau + \lambda$$

gilt.

Die gesuchte Periodenlänge  $\tau_1$  und ihre Vielfachen lassen sich bei den Minima der Funktion  $\tilde{\varphi}(\tau)$  ablesen.

In den Tabellen 1, 2 und 3 stellt  $\tau_1$  die Hauptperiodenlänge dar, die sich aus dem jeweils tiefsten Minimum errechnet. Aus zum Teil auftretenden weniger tiefen Nebenminima liessen sich Nebenperiodizitäten ( $\tau_2, \tau_3$ ) ermitteln, die der jeweiligen Hauptperiodizität überlagert waren. Die auftretenden endogenen Perioden konnten zum Teil an Hand eines Vielfachen ihrer Länge genauer bestimmt werden als an Hand ihres ersten in der Fehlerkurve auftretenden Minimums. Die Phasenwinkeldifferenz (PWD) errechnete sich aus dem zeitlichen Abstand zwischen dem Medianwert der Aktivitätsperiodik und dem Mittelpunkt der Dunkelphase (Vorzeichen im üblichen Sinne<sup>5</sup>).

**Ergebnisse und Diskussion.** Sowohl im 8/8-, 10/10- als auch im 16/16-Std-Tag war die Mehrzahl der Käfer voll synchronisiert. Dass hierbei keine «Maskierung» vorlag,

bewies das Verhalten der PWD, die im 8/8- und 10/10-Std-Tag kleiner, im 16/16-Std-Tag grösser als in den 12/12-Std-Vergleichsversuchen waren<sup>6</sup>. Im 8/8-Std-Tag traten jedoch bei den Tieren 3, 7 und 9, im 10/10-Std-Tag beim Käfer 10 Hauptperioden auf, die von der Frequenz des Licht-Dunkel-Wechsels erheblich abwichen und um 24 Std lang waren. Nebenperioden dieser Art traten beim

Tabelle 1. Versuch mit 8/8-Std-Tagen

| Tier | $\tau_1$ | $\tau_2$ | PWD <sub>8/8</sub> | PWD <sub>8/8</sub> -PWD <sub>12/12</sub> |
|------|----------|----------|--------------------|------------------------------------------|
| 1    | 16       | 23,1     | -2,5               | -1,5                                     |
| 2    | 16       |          | -6,5               | -3,5                                     |
| 3    | 25,8     | 16       |                    |                                          |
| 4    | 16       |          | -5                 | -3                                       |
| 5    | 16       |          | -3                 | -3                                       |
| 6    | 16       |          | -2                 | -4,5                                     |
| 7    | 23,3     |          |                    |                                          |
| 8    | 16       |          | -3                 | -4,5                                     |
| 9    | 24,0     |          |                    |                                          |
| 10   | 16       |          | -1                 | -1,5                                     |

Dauer: 470 Std.  $\tau$  = Periodenlänge, PWD = Phasenwinkeldifferenz (s. Text). Die angegebenen Zahlen stellen jeweils ganze Stunden dar. Die PWD wurde nur im Synchronisationsfall ausgerechnet (Hauptperiodenlänge  $\tau_1$  = Periodenlänge des Licht-Dunkel-Wechsels). Es wurden 12 Tiere untersucht, von denen einige inaktiv waren. Tier 1–6: 2 Lux, Tier 7–12: 50 Lux in den Lichtphasen.

Tabelle 2. Versuch mit 10/10-Std-Tagen

| Tier | $\tau_1$             | $\tau_2$ | $\tau_3$ | PWD <sub>10/10</sub> | PWD <sub>10/10</sub> -PWD <sub>12/12</sub> |
|------|----------------------|----------|----------|----------------------|--------------------------------------------|
| 2    | 20                   |          |          | -1                   | -4                                         |
| 4    | 20                   |          |          | -3                   | -6,5                                       |
| 5    | 20                   |          |          | -3                   | -6                                         |
| 6    | 20                   |          |          | -12                  | -16,5                                      |
| 8    | 20–20,5 <sup>b</sup> |          |          | -6                   | -9,5                                       |
| 10   | 22,5                 | 20       | 10,5     |                      |                                            |
| 11   | 20                   | 23,1     |          | -8,5                 | -7,5                                       |
| 12   | 20                   |          |          | -3                   | - <sup>a</sup>                             |

Dauer: 266 Std. (s. Tab. 1). <sup>b</sup> Unscharfes Minimum, PWD für  $\tau_1 = 20$  errechnet. <sup>a</sup> Im 12/12-Std-Tag nicht aktiv.

Tabelle 3. Versuch mit 16/16-Std-Tagen

| Tier | $\tau_1$ | $\tau_2$ | $\tau_3$ | PWD <sub>16/16</sub> | PWD <sub>16/16</sub> -PWD <sub>12/12</sub> |
|------|----------|----------|----------|----------------------|--------------------------------------------|
| 1    | 32       | 16       |          | +8                   | +8                                         |
| 2    | 32       | 16       | 21,5     | +11                  | +16                                        |
| 5    | 32       | 16       |          | +10                  | +7,5                                       |
| 9    | 32,5     |          |          | +10 <sup>b</sup>     | - <sup>a</sup>                             |
| 10   | 32       | 16       | 24       | +7,5                 | +5,5                                       |
| 12   | 32       |          |          | +13                  | - <sup>a</sup>                             |

Dauer: 451 Std. (s. Tab. 1). <sup>b</sup> Für  $\tau = 32$  errechnet. <sup>a</sup> Im 12/12-Std-Vergleichsversuch nicht aktiv.

<sup>4</sup> D. M. A. MERCER, in Symposia of Quantitative Biology (Ed. J. ASCHOFF; Biological Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1960), vol. 25, p. 73.

<sup>5</sup> J. ASCHOFF, K. KLOTTER und R. WEVER, in *Circadian Clocks* (Ed. J. ASCHOFF; North Holland, Amsterdam 1965), p. 10.

<sup>6</sup> R. WEVER, in *Circadian Clocks* (Ed. J. ASCHOFF; North Holland, Amsterdam 1965), p. 47.

Tier 1 im 8/8-Std-Tag, beim Tier 11 im 10/10-Std-Tag und bei den Tieren 2 und 10 im 16/16-Std-Tag auf (Tabellen I, II, III). Diese Perioden wichen teilweise deutlich etwas von 24 Std ab, in einigen Fällen (im 8/8- und 16/16-Std-Tag) waren sie gleich 24 Std. Im ersten Fall kann ihr endogener Ursprung als erwiesen gelten; im zweiten Fall könnte man an den Einfluss eines nicht ausgeschalteten, unbekannten 24-Std-Zeitgebers denken. Möglicherweise liessen sich diese Käfer aber durch die 8/8-beziehungsweise 16/16-Std-Tage zu einer 24-Std-Periodik synchronisieren. Dies ist insofern denkbar, als beide Periodizitäten mit der 24-Std-Periodizität in relativ kurzen Abständen koinzidierten. Dann aber wäre die Synchronisation zur 24-Std-Periodik ein weiterer Hinweis auf eine zugrunde liegende endogene Circadian-Periodizität.

Die Ergebnisse zeigen, dass *C. cancellatus* einerseits einen ungewöhnlich grossen, innerhalb anderer Tierordnungen noch nicht beobachteten Mitnahmebereich hat<sup>3</sup>: sowohl im 8/8-Std- als auch im 16/16-Std-Tag ist noch Synchronisation möglich. Andererseits lösten sich einige Käfer im 8/8-, 10/10- und 16/16-Std-Tag mehr oder

weniger vollständig vom Licht-Dunkel-Wechsel und zeigten eine circadiane Eigenperiodizität. Damit ist die Existenz einer selbst-erregten Circadian-Schwingung auch bei Carabiden erwiesen.

**Summary.** Most of the active individuals of *Carabus cancellatus* (Coleoptera) investigated were synchronized by 'zeitgeber'-lengths of 8/8 10/10 or 16/16 h. On the other hand, a smaller number of beetles lost the periodicities of these 'zeitgebers' and showed a circadian activity rhythm. According to these experiments, the existence of a self-sustained circadian oscillation in carabid beetles is demonstrated. As we believe, a special numerical method of computing the length of activity periodicities was used for the first time.

G. LAMPRECHT und F. WEBER

Rechenzentrum der Universität und  
Zoologisches Institut der Universität,  
D-44 Münster (Westfalen, Deutschland), 8. September 1969.

## The Influence of Cations on Contracture in the Superfused Ventricle of *Helix aspersa*

**Methods.** Ventricles were removed from hydrated snails<sup>1</sup> and superfused in the apparatus of LAMB and MCGUIGAN<sup>2</sup> by means of downward jets of saline which entered each ventricle through a hole in its upper aspect. Contractures were induced by stimulation with alternating current of 6 V, 50 Hz. About half the ventricles beat spontaneously. The basic (control) saline contained 40 mM NaCl, 4 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 mM NaHCO<sub>3</sub>. It was equilibrated with 1.5% CO<sub>2</sub> in oxygen to give a pH of 7.6–7.8. In solutions containing different concentrations of calcium or magnesium, the osmotic pressure was kept constant either by adjustments in the amount of sodium present or by addition of sucrose, similar results being obtained either way. To investigate the possible influence of sodium, the bicarbonate buffer was replaced by one of *tris*(hydroxymethyl)aminomethane (16 mM, adjusted to pH 7.7 with HCl).

The procedure used to compare contractures in the presence of different concentrations of calcium was as follows: The heart was superfused with calcium-free saline for about 1 min, within which time the response to stimulation would disappear. The test solution was then applied and, after equilibration, 3 or 4 contractures were induced. Then the ventricle was equilibrated with the control solution and 3 or 4 more contractures were induced. The cycle was repeated for other test solutions. The effects of variations in magnesium and sodium were studied in a similar way, except that the ventricles were not equilibrated with calcium-free saline. The isometric contractures were of 3 characteristic forms, as shown in Figure 1. Contracture tensions were measured, as indicated, as the differences between resting or diastolic tensions and the steady values attained during stimulation and were expressed as percentages of control values obtained immediately afterwards.

**Results and discussion.** The relations between contracture tension and concentration of calcium and magnesium are shown in Figures 2 and 3. (A relation similar to that of curve A was found when contractures were induced by replacing 50 mM of the sodium with potassium.) Varying the concentration of sodium (as chloride) over the range 0–230 mM, while keeping the osmotic pressure constant

with sucrose, had no significant effect on contracture tension in 6 ventricles.

Between periods of electrical stimulation, non-beating ventricles seemed to be in a state of tonus and, on a few occasions, stimulation at lower than usual intensity caused a slight fall in tension, perhaps through an effect on inhibitory nerve endings. Moreover, in the quiescent heart, there was a slight fall in tension when the level of calcium was lowered. In contrast, as reported for *H. pomatia*<sup>3</sup>, and associated with partial depolarization<sup>4</sup>, a beating ventricle deprived of extracellular calcium would immediately increase its rate and amplitude of beating and then gradually stop in systole. If calcium were then replaced, the tension would at once fall, though not always with resumption of beating, but, if superfusion with calcium-free solution continued, tension would fall gradually over a period of several minutes.

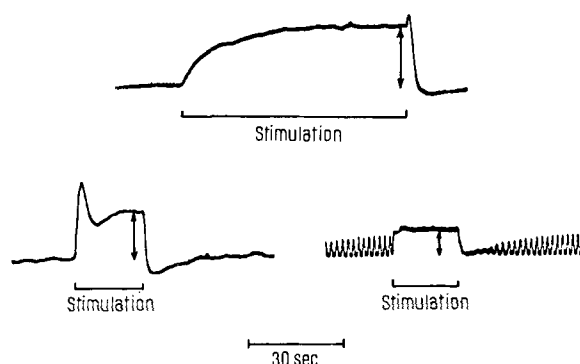


Fig. 1. Characteristic changes in tension in isolated ventricles on stimulation with alternating current. The manner of measuring steady contracture tension is shown for each.

<sup>1</sup> R. F. BURTON, Comp. Biochem. Physiol. 25, 501 (1968).

<sup>2</sup> J. F. LAMB and J. A. S. MCGUIGAN, J. Physiol. 786, 261 (1966).

<sup>3</sup> L. T. HOGGEN, Q. Jl. exp. Physiol. 15, 263 (1925).

<sup>4</sup> J. R. LOUDON, personal communication.