

MCLEAN and BROWN³. Non-collagenous protein was measured according to the method of LOWRY et al.⁴.

Results. Normal soleus exhibited 3 times as much hexokinase activity as the corresponding gastrocnemius muscle (Table). Denervation caused a progressive rise in this activity which, after 8 weeks, attained a 2-fold increase in the soleus and a 5-fold increase in the gastrocnemius, when using non-collagenous protein as a reference base. Mixing of different homogenates in various proportions consistently gave additive results, thus ruling out the presence of hexokinase inhibitors or activators to account for the differences found in enzyme activity.

Discussion. Hexokinase activity displays, both in control and in denervated muscles, just the opposite pattern of most enzymes associated with glycolysis. The connective tissue levels and enzymes of the pentose-phosphate pathway follow a similar pattern to that of hexokinase⁵. Previously, I have proposed that the pentose-phosphate pathway in skeletal muscles originates from their connective tissue, rather than from the muscle cells⁵. On the basis of a similar parallelism between connective tissue levels and the activity of hexokinase, it can be speculated that this enzyme is very active in the connective tissue of skeletal muscles.

Hexokinase occurs in multiple molecular forms, probably corresponding to different cellular or tissue compartments⁶. Two or more of these forms are present in muscles. On the other hand, at least 2 glucose-6-phosphate pools, exhibiting marked differences in their response to insulin, appear to exist in skeletal muscle⁷. The values in the present report probably reflect the combined presence of two or more molecular forms of

hexokinase, with connective tissue making a major contribution to the total hexokinase activity measured. It can be speculated that one of the enzyme forms exists within the muscle cells, in association with glycolytic enzymes and one of the glucose-phosphate pools, while another form resides in connective tissue elements and is associated the pentose-phosphate pathway and the other glucose-phosphate pool.

Resumen. La actividad de la hexoquinasa es mayor en el músculo rojo que en el blanco, y ésta aumenta como resultado de la denervación. Tales resultados son lo opuesto de los observados para la mayoría de las enzimas glicolíticas. Estos son explicables si una de las isoenzimas de la hexoquinasa se encuentra localizada dentro del tejido conjuntivo del músculo esquelético.

L. GARCÍA-BUÑUEL

Veterans Administration Hospital, and
University of Oregon Medical School, Sam Jackson Park,
Portland (Oregon 97207, USA), 23 May 1972.

³ P. MCLEAN and J. BROWN, Biochem. J. 98, 874 (1966).

⁴ O. H. LOWRY, N. H. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. G. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

⁵ L. GARCÍA-BUÑUEL and V. M. GARCÍA-BUÑUEL, Nature, Lond. 213, 913 (1967).

⁶ J. W. ANDERSON, R. H. HERMAN, J. B. TYRREL and R. M. COHN, Am. J. clin. Nutr. 24, 642 (1971).

⁷ C. C. DULLY, R. M. BOCEK and C. H. BEATTY, Endocrinology 84, 855 (1969).

Circadian-Rhythmic und Gruppenverhalten bei *Leucaspis delineatus* (Pisces, Cyprinidae)

Untersuchungen zur Gültigkeit der Circadian-Regel¹⁻³ an Fischen fehlten bisher. Daher haben wir mitteleuropäische Süßwasserfische auf die Abhängigkeit ihrer lokomotorischen Aktivität von unterschiedlichen Beleuchtungsstärken geprüft. In diesem Zusammenhang wurde nicht nur die circadiane Periodik eines aus dem sozialen Gruppen- bzw. Schwarmverband eliminierten Einzeltieres, sondern auch die von Fischgruppen, untersucht. Obwohl es für die gegenseitige Synchronisation in Populationen eine Anzahl von Hinweisen gibt^{4,5}, ist dieser Effekt im Labor unter Dauerbedingungen bisher nur selten nachgewiesen worden⁶⁻⁸.

Wir untersuchten den Süßwasserschwarmfisch *Leucaspis delineatus* Heckel unter konstanter Beleuchtung von 4, 66 und 140 Lux, bzw. im Licht-Dunkel-Wechsel 12:12 Stunden, bei konstanter Temperatur. Die Registrierung der Schwimmaktivität erfolgte über Lichtschranken und Impulszählern^{9,10}. Vor Beginn der Versuche im November/Dezember mit konstanter Beleuchtung waren 9 Einzeltiere und 3 Gruppen ($n = 7$) mit einem 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Wechsel ($L = 66$ Lux) synchronisiert. In den ersten Versuchstagen verhielten sich die Gruppen sehr einheitlich. Nach 1-2 Übergangsperioden, die unberücksichtigt blieben, setzte bei den Gruppen die Spontanperiodik ein, und an den darauffolgenden Tagen verschoben sich die Aktivitätsphasen nach links (vgl. Figur 1). Somit verkürzten sich bei den Tiergruppen die Periodenlängen. Durch die Verkürzung der Gesamt-periodenlänge im Dauerlicht von 66 Lux hat sich der Aktivitätsschwerpunkt¹⁰ vom 9. Nov.-21. Nov. gegenüber dem 12:12 Stunden-Tag bei Gruppe 5 um 7,5 h, bei Gruppe 4 um 8,5 h und bei Gruppe 2 um 8,2 h phasenver-

schen. Die für jede Gruppe errechnete Steigung ist ein direkter Ausdruck der Frequenzabweichung gegenüber dem 24-Stunden-Rhythmus (Abszissen-Parallele) und zeigt, dass alle Versuchsgruppen von der 24-Stunden-Periode abweichen, also per definitionem eine Spontanfrequenz aufweisen¹¹. Die mittlere Periodenlänge der 3 untersuchten Gruppen beträgt $\tau = 22,33 \pm 0,03$ h.

Auch bei den Einzeltieren liess sich unter LL 66 Lux eine Spontanfrequenz in der gleichen Jahreszeit nachweisen. Die Periodenlänge betrug weniger als 24 h und war somit genau wie bei den Gruppen verkürzt. Im Unterschied zu diesen ist die Spontanfrequenz jedoch nur über einen kurzen Zeitraum von meist 2-3 Tagen ausgeprägt. Dann treten Auflösungserscheinungen auf. Die Tiere waren fast ständig aktiv und eine Periodik nicht mehr exakt festzustellen.

¹ J. ASCHOFF, Z. Tierpsychol. 15, 1 (1958).

² J. ASCHOFF, *Circadian Clocks* (North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1965).

³ R. WEVER, Z. Tierpsychol. 51, 1 (1964).

⁴ J. ASCHOFF, A. Rev. Physiol. 25, 581 (1963).

⁵ H. REMMERT, *Handbuch der Biologie* Akademische Verlagsgesell. Athenaion, Frankfurt a. M. (1965), vol. 5, p. 1.

⁶ K. HOFFMANN, Z. vergl. Physiol. 43, 544 (1960).

⁷ J. MEDOGORAG und M. LINDAUER, Z. vergl. Physiol. 55, 450 (1967).

⁸ F. WEBER, Zool. Jb. Physiol. 72, 136 (1966).

⁹ R. SIEGMUND, Biol. Zentbl. 88, 295 (1969).

¹⁰ R. SIEGMUND und D. L. WOLFF, forma et functio 5, 33 (1972).

¹¹ Zu freilaufenden Rhythmen bei Fischen unter natürlichen Lichtverhältnissen vgl. K. MÜLLER, Naturwissenschaften 55, 140 (1968) und K. MÜLLER, Oikos 20, 166 (1969).

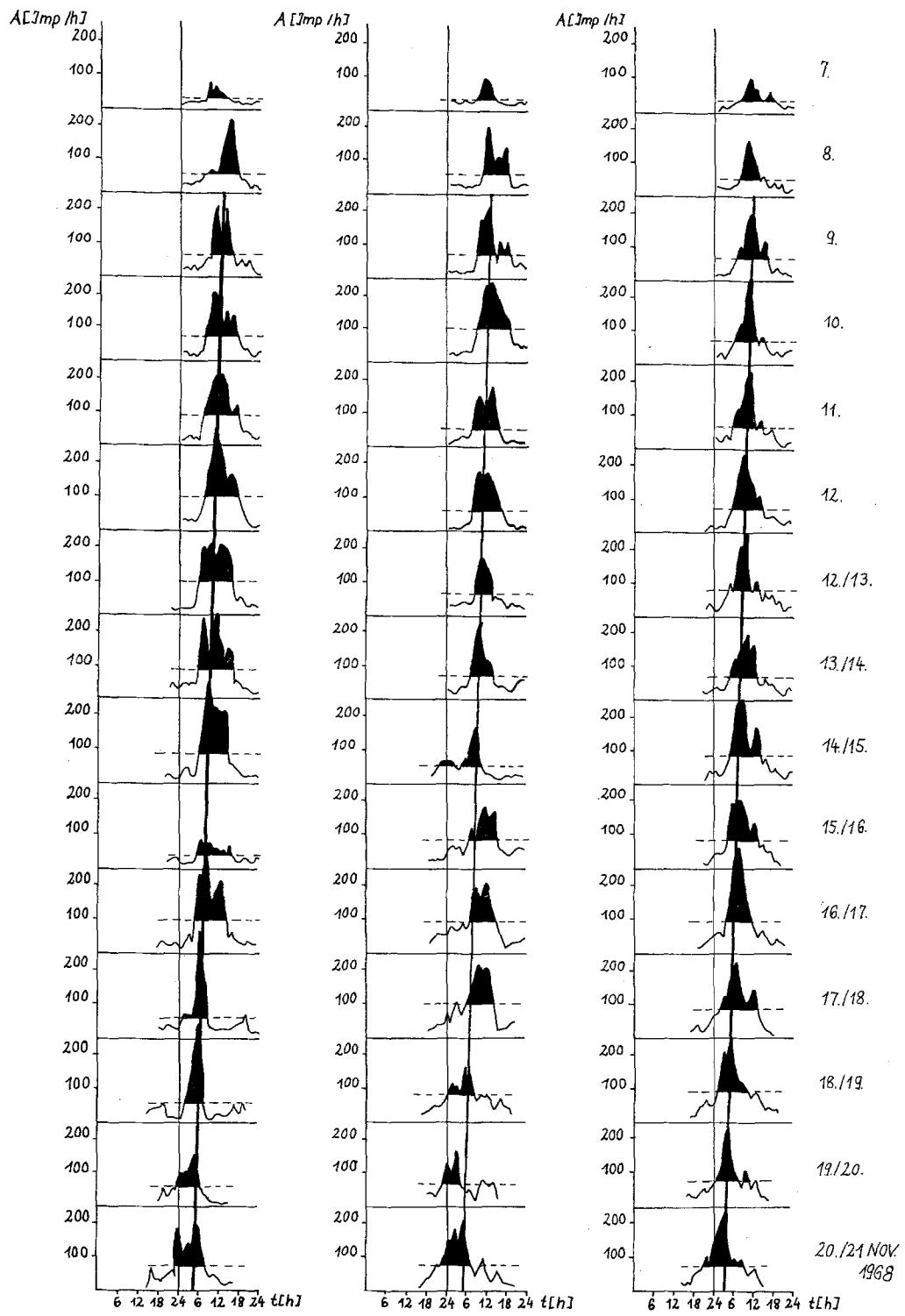


Fig. 1. Fortdauer der Aktivitätsperiodik der Gruppen im Dauerlicht von 66 Lux. Von links nach rechts. G5 (Periodendauer $\tau = 23,37 \pm 1,54$ h), G4 ($\tau = 23,29 \pm 0,41$ h) und G2 ($\tau = 23,31 \pm 0,79$ h).

Die Richtung und die Grösse der auf den Aussentag bezogenen Phasenverschiebung hängt von der Beleuchtungsstärke ab, wobei sich bei den tagaktiven *Leucaspisus delineatus* die mittleren Periodenlängen mit zunehmender Beleuchtungsstärke verkürzen und mit abnehmender verlängern müssten (Circadian-Regel). Nach einem zwischengeschalteten LD-Wechsel (66:0 Lux) sind zunächst

dieselben Fische und Fischgruppen, die schon unter LL 66 Lux untersucht wurden, einer Beleuchtungsstärke von 140 Lux ausgesetzt worden. Auch hier traten jeden Tag die Aktivitätsphasen etwas früher auf. Die Verkürzung ist grösser als bei LL 66 Lux. Unter Dauerlicht von 140 Lux bleibt die endogene Rhythmus-Komponente bei den Einzeltieren ebenfalls deutlich erhalten. Unter die-

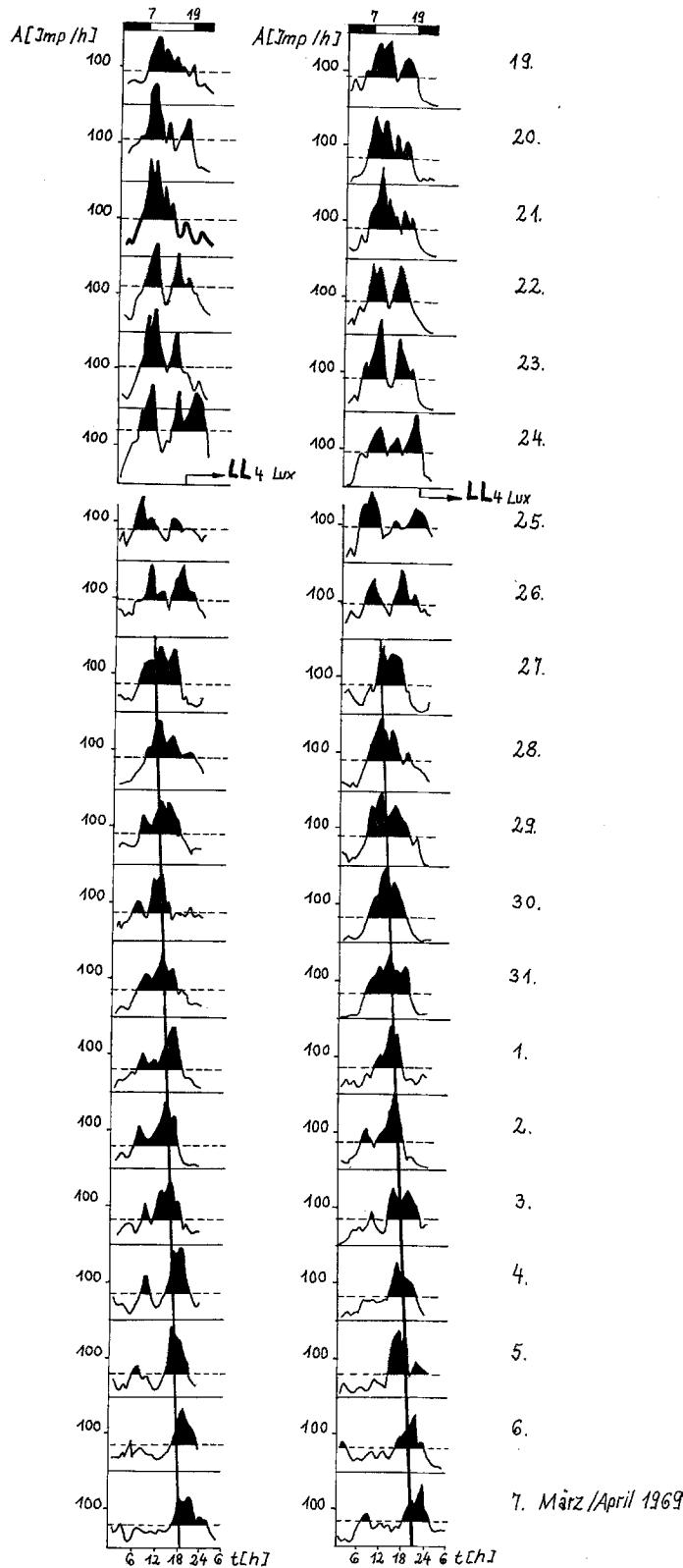
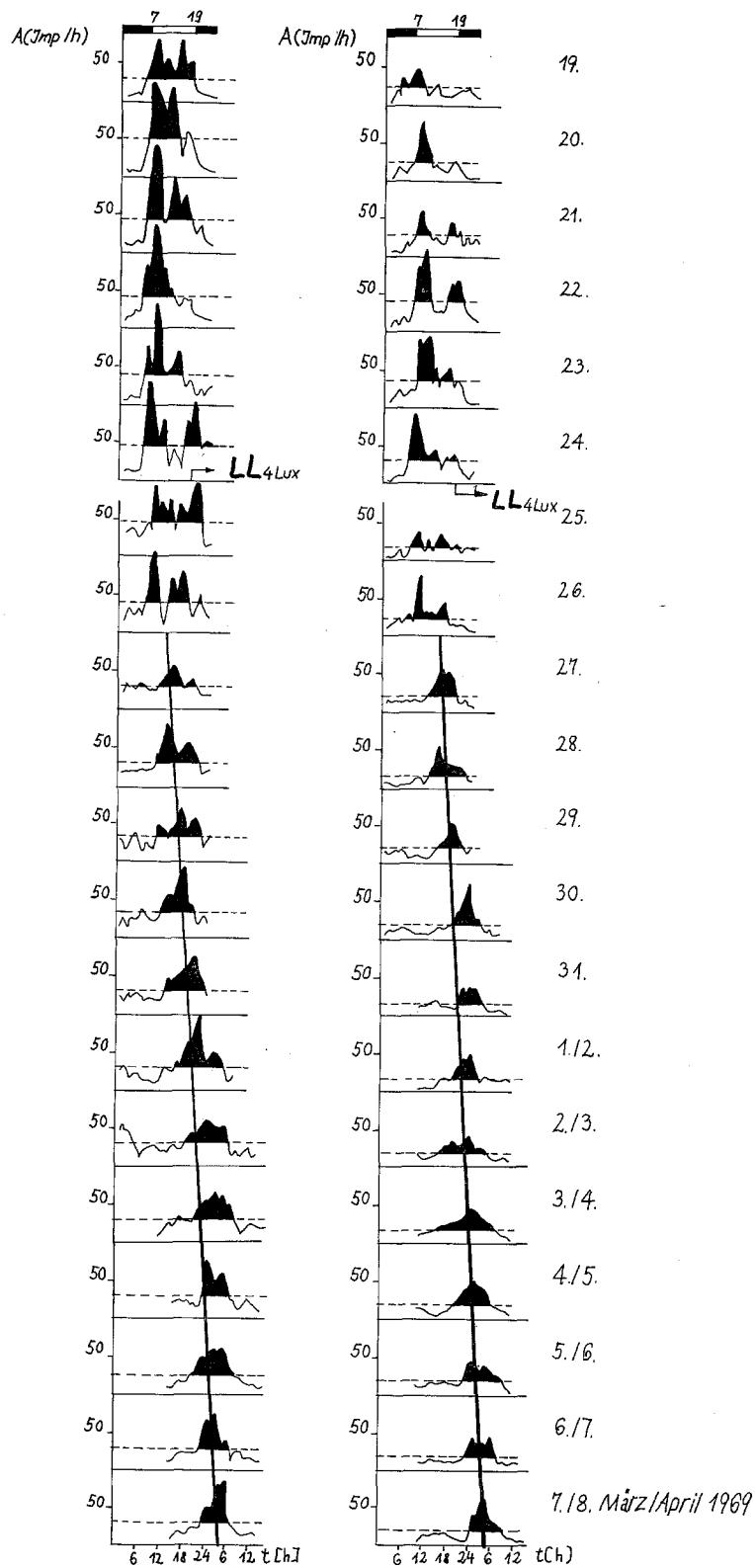


Fig. 2 a

a) Beispiele für zwei Gruppen im Dauerlicht von 4 Lux (März/April). LL beginnt am 24. März, 19.00 Uhr; darüber sind einige Tage im LD 12:12 h, 66:0 Lux, aufgezeichnet. Links = Gruppe 5, rechts = Gruppe 2. Waagrechte gestrichelte Linien: Berechnetes Aktivitätsniveau über 24 h. Die eingezzeichnete Steigung verdeutlicht das Freilaufen der Periodik im Dauerlicht. Bei 4 Lux Dauerlicht hat die Steigung ein anderes Vorzeichen als bei 66 Lux.

sen Beleuchtungsverhältnissen stimmen die Frequenzen der Tiergruppen und Einzeltiere überein. Die mittlere Periodenlänge (Versuchszeit 18 Tage) bei den Einzeltieren beträgt $22,26 \pm 0,4$ h und bei den 3 Gruppen $21,95 \pm 0,09$ h.

In einem dritten Versuch wurde allen Tieren nach 27 Tagen LD 12:12 (66:0 Lux) ein Dauerdämmer (LL 4 Lux) angeboten. Auch beim Übergang zum Dauerdämmer wurde die Aktivitätsform beibehalten. Figur 2 gibt dafür einige repräsentative Beispiele. Im schwachen



b) Beispiele für zwei Einzeltiere im Dauerlicht von 4 Lux (vgl. auch Legende zu Figur 2a).

Dauerlicht sinkt die Aktivitätsmenge, und die Aktivitätszeit wird bei den Einzeltieren und Populationen kürzer. Die mittlere Periodendauer für alle 3 Tiergruppen beträgt $24,79 \pm 0,07$ h (= 24 h 47 min). Ausserdem treten die interindividuellen Unterschiede im Dauerdämmer bei den Einzeltieren viel stärker hervor als im Dauerlicht höherer Beleuchtungsstärke. Für das Einzeltier Nr. 12

wurde eine Spontanperiode von $25,27 \pm 1,36$ h, für Nr. 11 von $25,72 \pm 1,42$ h und für Nr. 9 von $25 \pm 1,04$ h berechnet. Die Verschiebung der Periode in den 11 Versuchstagen von 14 h (Nr. 12), 18,9 h (Nr. 11) und 11,2 h (Nr. 9) drückt sich auch in der mittleren Periodenlänge dieser Tiere aus ($\bar{\tau} = 25,33 \pm 0,26$ h). Die Periodenlängen der Gruppen und Einzeltiere im Dauerlicht von 4 Lux

unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$; U-Test von MANN und WHITNEY und nach dem FISHER-PITMAN-Test für unabhängige Stichproben).

Aus den Untersuchungen geht hervor, dass sich die gegenseitige Beeinflussung der Fische innerhalb der Gruppe synchronisierend auswirkt. Die Ergebnisse aus den Wintermonaten deuten darauf hin, dass neben dem Licht-Dunkel-Wechsel auch andere Synchronisationsfaktoren von entscheidender Bedeutung sein könnten. In den Monaten November/Dezember werden die Fische, während sie sich im Schwarm auf die Winterruhe vorbereiten, durch den natürlichen LD-Wechsel synchronisiert. Fällt unter Laborbedingungen dieser Steuerfaktor aus, ist bei den Einzeltieren das rhythmische Verhalten nicht mehr in der arttypischen Form ausgeprägt.

In Versuchen wurde die Bedeutung des optischen und chemischen Informationskanals für die Synchronisation von Einzeltieren untereinander analysiert. Überraschend war der deutliche circadiane Rhythmus, den sowohl linsen- als auch augenekleerte Gruppen unter Licht-Dunkel- und Dauerdunkel-Bedingungen aufwiesen¹². Somit konnte die optische Kommunikation nicht der alleinige Synchronisationsfaktor für die ausgeprägte circadiane Periodik innerhalb der Gruppe sein. Deshalb wurde in weiteren Experimenten die chemische Kommunikation ebenfalls überprüft. Die Streuung der Spontanfrequenzen bei den in Chemokommunikation stehenden Fischen war kleiner als bei den Tieren, die keine Möglichkeit zum Informationsaustausch hatten, da die optische Kommunikation im Dauerdunkel ausfiel.

Die Unterschiede in den Periodenlängen von 4, 66 und 140 Lux sind bei den Gruppen signifikant ($p < 0,05$; Rangvarianzanalyse nach FRIEDMANN). Bei den Einzeltieren lassen sich die Unterschiede der Spontanperioden von 4 und 140 Lux mit $p < 0,01$ sichern (*t*-Test). Nach diesen Ergebnissen gilt die Circadian-Regel auch für Fische. Der zusätzliche Einfluss sozio-ökologischer Faktoren für die Synchronisation wurde durch die Gruppenuntersuchungen deutlich.

Summary. In constant illumination fish groups and isolated fish exhibit a free running rhythm. The period length of the day active animals decreases with increasing light intensity and vice versa. The results correspond to the circadian rule, the validity of which has proved correct now for fish, too. The synchronization within fish groups is also influenced by socio-ecological factors.

R. SIEGMUND und D. L. WOLFF

Sektion Biologie der Humboldt-Universität,
Bereich Verhaltenswissenschaften, Invalidenstrasse 43,
DDR-104 Berlin (DDR), 18. Juli 1972.

¹² R. SIEGMUND und D. L. WOLFF, forma et functio, im Druck.

¹³ Herrn Prof. Dr. G. TEMBROCK danken wir für anregende Diskussion.

Role of Muscular Disuse in the Genesis of Fibrillation in Denervated Muscle

Fibrillation following denervation of skeletal muscle is generally¹⁻³ held to be due to cessation of a trophic effect of the nerve on the muscle, rather than to the muscular changes caused by disuse, since it is not observed in muscular disuse of different origin⁴⁻⁷, even though muscle atrophy can develop to about the same degree as after denervation.

In the present paper it will be seen that fibrillation sets in much earlier than usually if spinal cord transection, or

plaster cast immobilization of the limb, or tenotomy are carried out some days before denervation. These observations suggest that in the genesis of this type of muscular activity, muscular changes caused simply by disuse are likely to play a definite role.

Methods. Adult albino rats, weighing 250–300 g, were used throughout. All surgical procedures were performed under ether anaesthesia. In one group of animals, the spinal cord was sectioned at the mid-thoracic level, and one sciatic nerve was cut 1–15 days later, near the trochanter. In another group, both hind limbs were immobilized by a plaster cast, one limb in flexion and the other in extension, and after 1–15 days the cast was removed and the sciatic nerve was cut on both sides. In a third group, the tendo calcaneus was cut on one side, and 1–19 days later the sciatic nerve was cut on both sides. Electromyographic records were taken under ether anaesthesia, using a pair of needle electrodes which were introduced, through the skin, in several parts of the soleus-gastrocnemius muscular group. Records were first

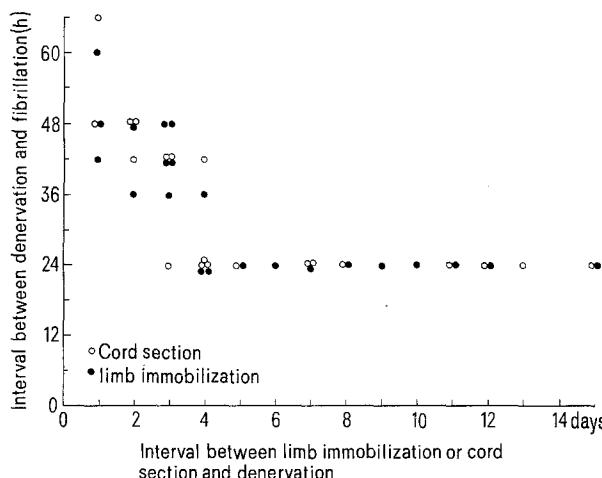


Fig. 1. Onset time of fibrillation in denervated muscles, as a function of the interval between spinal cord section, or the beginning of limb immobilization, and denervation. Individual values are presented from 42 animals.

¹ E. GUTMANN and P. HNÍK, in *The Denervated Muscle* (Ed. E. GUTMANN; Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague 1962), p. 13.

² E. GUTMANN, in *The Effect of Use and Disuse on Neuromuscular Functions* (Ed. E. GUTMANN and P. HNÍK; Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1963), p. 29.

³ C. EYZAGUIRRE, *Physiology of the Nervous System* (Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago 1969), p. 197.

⁴ S. S. TOWER, Archs Neurol. Psychiat., Chicago 42, 219 (1939).

⁵ J. C. ECCLES, J. Physiol. 103, 253 (1944).

⁶ D. Y. SOLANDT, R. C. PARTRIDGE and J. HUNTER, J. Neurophysiol. 6, 17 (1943).

⁷ S. S. TOWER, H. HOWARD and D. BODIAN, J. Neurophysiol. 4, 398 (1941).