

less activity than the granules isolated from them. The pretreatment of the lyophilized powder with ether-petroleum ether extraction before it was suspended in water seemed to yield higher activities than when the powder is used untreated. This extraction removed a considerable portion of the egg pigment which is contained almost entirely in some of the granules. Ether extraction is thought to allow better wetting of the granular material and hence a higher apparent apyrase activity.

*Discussion.* Since apyrase appears, at least to some extent in many different fractions of the egg, one has the impression that present methods of separation are not satisfactory for removing preferentially this enzyme, or else that it is a widely distributed substance adsorbed to many proteins. The fact that in the frog<sup>1</sup> there are 3 protein fractions giving reasonable apyrase activities, and that in other experiments<sup>2</sup> apyrase activity is not separated into a single fraction are in general accord with the present experiments. In this connection, experiments by RUNNSTRÖM<sup>3</sup> indicate that the unfertilized egg has an appreciable amount of ATP normally present. There is no reason to suppose that this substance is not uniformly distributed throughout the egg, hence it is necessary to suppose that such apyrase as is present is in some way "inactive". The experiments of CENNAMO and MONTELLO<sup>4</sup> show that upon cytolysis sea-urchin eggs give an acid reaction which can quantitatively be equated to ATP breakdown. The question then arises as to whether some of the observed apyrase activity can be ascribed to the "activation" of the enzyme during the chemical treatment of the egg materials. At any rate, since chemical treatments of fertilized and unfertilized eggs were the same the observed differences in apyrase activity can be considered real.

It is difficult to evaluate the possibility of utilization of ATP by the fertilized egg as far too little is known about the chemical processes taking place. Evidence has been presented that in the developing frog egg<sup>5</sup> ATP is broken down under anaerobic conditions, and is resynthesized under aerobic conditions. Both of these reactions take place while there is considerable apyrase activity in the cell. Since the ATP concentration in the egg after fertilization tends to remain constant, if we grant an increased apyrase activity it must follow that the synthetic activities responsible for the production of ATP are increased proportionally with the increase in apyrase<sup>6</sup>.

I am indebted to Prof. R. DOHRN for the use of the facilities of the Zoological Station, to Dr. A. MONROY for much valuable advice, and to Prof. J. RUNNSTRÖM for reading the manuscript.

LORIN J. MULLINS<sup>7</sup>

Zoological Station, Naples<sup>8</sup>, August, 22 1949.

### Zusammenfassung

Sowohl befruchtete als auch nicht befruchtete Seeigel-eier enthalten allein Anschein nach aktive Apyrase. Die Aktivität scheint in der Hauptsache in den körnigen Teilen des Protoplasmas lokalisiert zu sein. Gleich nach der Befruchtung steigt die gesamte Apyraseaktivität der Eier an. Diese gesteigerte Enzymtätigkeit findet sich wiederum hauptsächlich in den Zellkörnchen. Das Verhältnis zwischen Apyraseaktivität und Energiebedarf während der Entwicklung wird untersucht.

<sup>1</sup> L. G. BARTH and L. JAEGER, *J. Cell. Comp. Physiol.* 30, 111 (1947).

<sup>2</sup> W. M. CONNORS and B. T. SCHEER, *J. Cell. Comp. Physiol.* 30, 271 (1947).

<sup>3</sup> J. RUNNSTRÖM, *Biochem. Z.* 258, 257 (1933).

<sup>4</sup> C. CENNAMO and S. MONTELLO, *Exper.* 3, 10 (1947).

<sup>5</sup> L. G. BARTH and L. JAEGER, *Physiol. Zool.* 20, 133 (1947).

<sup>6</sup> J. BRACHET, *Embryologie chimique* p. 148 (Liège 1945).

<sup>7</sup> Merck Fellow of the National Research Council, Washington.

<sup>8</sup> Present Address: Department of Biophysics, Johns Hopkins University, Baltimore.

### Über die Einwirkung von Ultraschall auf Gelenkflüssigkeit

Die hohe Viskosität der Gelenkflüssigkeit ist hauptsächlich durch ihren Gehalt an Hyaluronsäure, einer hochmolekularen Polysaccharidsäure, bedingt<sup>1</sup>. Enzymatische oder rein chemische Vorgänge, die depolymerisierend wirken, vermindern die Viskosität von Hyaluronsäurelösungen<sup>2</sup>. Wir haben den Einfluß von Ultraschall auf die Viskosität von Kniegelenkpunkten und von Hyaluronsäurelösungen aus Glaskörper untersucht. Die Gelenkflüssigkeiten wurden außerdem im Elektrophoreseversuch geprüft.

Die Beschallung der Lösungen erfolgte (ohne Ausschluß von Luft) in gewöhnlichen Reagenzgläsern. Die Gläser tauchten in ein mit Wasser gefülltes und von außen gekühltes Gefäß, das dem Schallkopf aufgesetzt wurde. Die vom Quarz (10 cm<sup>2</sup>) abgegebene Schallenergie betrug 55 W (gemessen in Wasser), die Frequenz 800 kHz. Die Viskositätsmessungen wurden mit einem Viskosimeter nach OSTWALD bei 37° C gemacht. Die (rohen) Hyaluronsäurelösungen wurden aus filtrierten Rinderherzglaskörpern nach Fällung mit Alkohol erhalten.

	Material	Beschallungsdauer (Minuten)	Relative Viskosität (37° C)
I	Gelenkflüssigkeit . . . . . (H., chronische Synovitis) . . .	0	12,8
		5	6,6
		10	2,7
		20	2,1
II	Gelenkflüssigkeit . . . . . (M., Meniskusläsion) . . . .	0	4,7
		5	2,0
		10	1,6
III	Gelenkflüssigkeit . . . . . (Sch., Tibiakopffraktur) . . . .	0	2,4
		1	2,2
IV	Hyaluronsäure (Glaskörper) . . . .	0	10,5
		10	5,1
		20	5,0
V	Hyaluronsäure (Glaskörper) . . .	0	6,8
		20	4,0

Die Einwirkung von Ultraschall führt zu einer beträchtlichen Abnahme der Viskosität der Gelenkflüssigkeit. In der Tabelle sind die Ergebnisse von Versuchen mit drei Gelenkpunkten verschieden hoher Viskosität aufgeführt. Nach einer Beschallungsdauer von zehn Minuten ist die Viskosität in Versuch I auf 21 %, in Versuch II auf 43 % und in Versuch III (in dem etwas dickere Reagenzgläser verwendet wurden) auf 67 % der Viskosität der unbeschallten Probe gesunken. Die aus Glaskörper gewonnenen Hyaluronsäurelösungen, die nur sehr geringe Proteingehalte enthalten, zeigen nach der Beschallung ebenfalls eine bedeutende Viskositätsabnahme.

Während der Beschallung steigt die Temperatur der Versuchslösung auf maximal 43° C. Fünfzehn Minuten langes Erwärmen von Gelenkflüssigkeit bei 44–46° C bewirkt jedoch keine Erniedrigung (sondern sogar eine Erhöhung) der Viskosität.

<sup>1</sup> Vgl. K. MEYER, *Physiol. Rev.* 27, 335 (1947). – CH. RAGAN und K. MEYER, *J. Clin. Invest.* 28, 56 (1949).

<sup>2</sup> Literatur siehe: L. HAHN, *Fermentforschung* 17, 417 (1944).

Hyaluronsäure läßt sich in der Gelenkflüssigkeit elektrophoretisch nachweisen<sup>1,2</sup>. Die in den Elektrophoresediagrammen von Gelenkpunkten auftretende «Hyaluronsäurezacke» (vgl. Abb. 1) ist in den mit beschallten Proben erhaltenen Diagrammen deutlich reduziert, ebenso die nahe der Albumingrenzschicht wandernde Komponente (Abb. 2). Ein ähnliches Diagramm liefert die Gelenkflüssigkeit nach Einwirkung von Hodenextrakt<sup>2</sup> (Hyaluronidase). Die bisherigen Elektro-

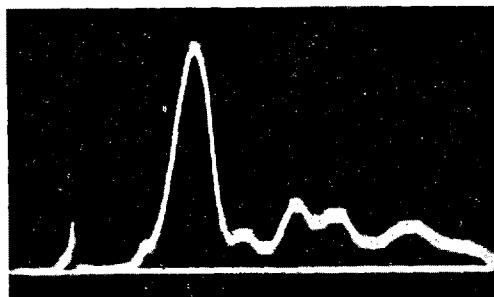


Abb. 1. Kniepunktat M, nicht beschallt.

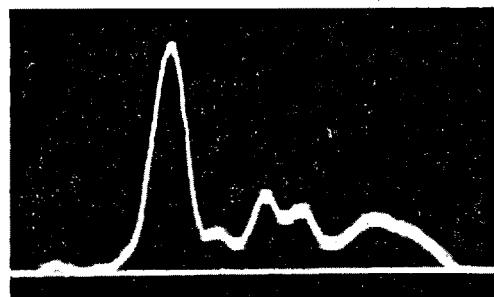


Abb. 2. Kniepunktat M, 10 Minuten lang beschallt.

Elektrophoresediagramme (absteigende Grenzschichten) von Kniepunktaten in Oxalat-Veronal-Acetatpuffer ( $p_H$  8,6,  $T$  0,1).

phoresevereversuche lassen noch keine mit Sicherheit auf die Ultraschalleinwirkung zu beziehende Veränderung der Proteine der Gelenkflüssigkeit erkennen. In einigen Proben ist nach der Beschallung eine geringe Zahl von Eiweißflockchen zu beobachten.

Hyaluronsäure wird durch Ultraschall offenbar depolymerisiert<sup>3</sup>. Über den Mechanismus dieses Vorganges und die dabei aus Hyaluronsäure entstehenden Produkte soll nach weiteren Untersuchungen berichtet werden.

W. HUNZINGER, H. SÜLLMANN und G. VIOLLIER

Eiweißlaboratorium der Medizinischen Klinik, Chirurgische Klinik und Institut für physikalische Therapie der Universität Basel, den 30. August 1949.

#### Summary

The viscosity of synovial fluids and hyaluronic acid solutions, obtained from vitreous humour, are lowered by ultrasonic vibrations. Electrophoretic analysis reveals that the content of hyaluronic acid in these ultrasonically treated solutions is diminished.

<sup>1</sup> G. Blix, Acta physiol. Scand. 1, 29 (1940). — L. Hesselvik, Acta med. Scand. 105, 153 (1940).

<sup>2</sup> O. Schürch, G. Vioillier und H. Süllmann, Helv. physiol. acta 7, C 23 (1948).

<sup>3</sup> Über die Depolymerisation von anderen hochmolekularen Stoffen vgl. A. Szalay, Z. physik. Ch. (A) 164, 234 (1933). — E. Thieme, Physik. Z. 39, 384 (1938). — G. Schmid und O. Rommel, Z. physik. Ch. (A) 185, 97 (1939); Physik. Z. 41, 326 (1940). — H. Gohr und Th. Wedekind, Klin. Wschr. 19, 25 (1940).

#### Der Einfluß von Jodcaseinpräparaten auf den Sauerstoffverbrauch der Larven von *Xenopus laevis* DAUDIN<sup>1</sup>

Es ist schon seit langem bekannt, daß Schilddrüsenpulver, Thyroxin und auch thyroxinhaltige Substanzen, wie Jodcaseinpräparate, die Metamorphoseprozesse in Amphibienlarven beeinflussen. Auf diese Erscheinungen haben DEANESLY und PARKES<sup>2</sup> ihren «Vorderbeindurchbruchtest», zur Bestimmung des Thyroxingehalts verschiedener Substanzen gegründet.

Diese Methode beruht also auf den von dem Thyroxin bewirkten äußeren morphologischen Änderungen.

Es ergab sich aus einer Arbeit von TUCHMANN-DUPLESSIS<sup>3</sup>, daß eine Eichungsmethode, beruhend auf histologischen Veränderungen in den Schilddrüsen der behandelten Versuchstiere, nicht brauchbar war.

Wir hofften nun, mittels eines dritten Kriteriums, nämlich der Änderungen im Metabolismus, gemessen am Sauerstoffverbrauch der Larven eine empfindliche quantitative Eichungsmethode ausarbeiten zu können.

Selbstverständlich sind die genaueren Beziehungen zwischen der induzierten Metamorphose und den Änderungen im Metabolismus der Larven hier von großer Bedeutung.

Trotz der vielen Untersuchungen herrscht auf diesem Gebiet keine Einigkeit unter den verschiedenen Autoren. UHLENHUTH<sup>4</sup> z.B. betrachtet die Metamorphose nach Thyreoidbehandlung als Folge eines gesteigerten Metabolismus. ETKIN<sup>5</sup> anderseits zeigte, daß der von früheren Autoren vielfach herbeigeführte Gewichtsverlust nicht als Beweis für Stoffwechseländerungen gelten darf, sondern nur auf Wasserverlust und Leerung des Darms beruht.

Was die Änderungen im Metabolismus von mit Schilddrüsen behandelten Amphibienlarven anbelangt, werden zur Hauptsache die folgenden zwei Ansichten vertreten.

GROEBBELS<sup>6</sup>, ABELIN und SCHEINFINKEL<sup>7</sup> und HELFF<sup>8</sup> fanden einen gesteigerten Sauerstoffverbrauch.

ETKIN konnte keine Änderungen im Sauerstoffverbrauch der behandelten Larven feststellen.

In unseren eigenen Experimenten haben wir darum immer mit jungen noch weit von der Metamorphose entfernten Larven gearbeitet, so daß Abweichungen im normalen Metabolismus, die die Metamorphose zweifellos hervorruft, nicht störend einwirken konnten.

#### Methoden

Die *Xenopus* Eier wurden in der gewöhnlichen Weise nach Einspritzung von gonadotropem Ciba-Hormon gewonnen. Den Larven wurde Brennesselpulver verfüttert (GASCHE<sup>9</sup>). Nach 20 Tagen sind die Larven geeignet für die Sauerstoffbestimmungen.

Während der Vorbehandlung von 3 Tagen befinden sich die Larven zu je fünf in Bechergläsern mit 200 cm<sup>3</sup> Jodcaseinsuspension

<sup>1</sup> 27. Mitteilung der «Forschungsabteilung für Endokrinologische Untersuchungen» der Niederländischen Organisation für angewandte landwirtschaftliche Untersuchungen.

<sup>2</sup> R. DEANESLY und A. S. PARKES, J. Endocrinol. 4, 324 (1945).

<sup>3</sup> H. TUCHMANN-DUPLESSIS, Bull. d'Hist. appl. et de Techn. microsc. 25, 123 (1948).

<sup>4</sup> ED. UHLENHUTH, Amer. Natur. 55, 193 (1921).

<sup>5</sup> W. ETKIN, Physiol. Zool. 7, 129 (1934).

<sup>6</sup> F. GROEBBELS, Z. Biol. 75, 155 (1922).

<sup>7</sup> I. ABELIN und N. SCHEINFINKEL, Pflügers Arch. 198, 151 (1923).

<sup>8</sup> O. M. HELFF, J. Exp. Zool. 45, 69 (1926).

<sup>9</sup> P. GASCHE, Rev. suisse Zool. 50, 202 (1943).