

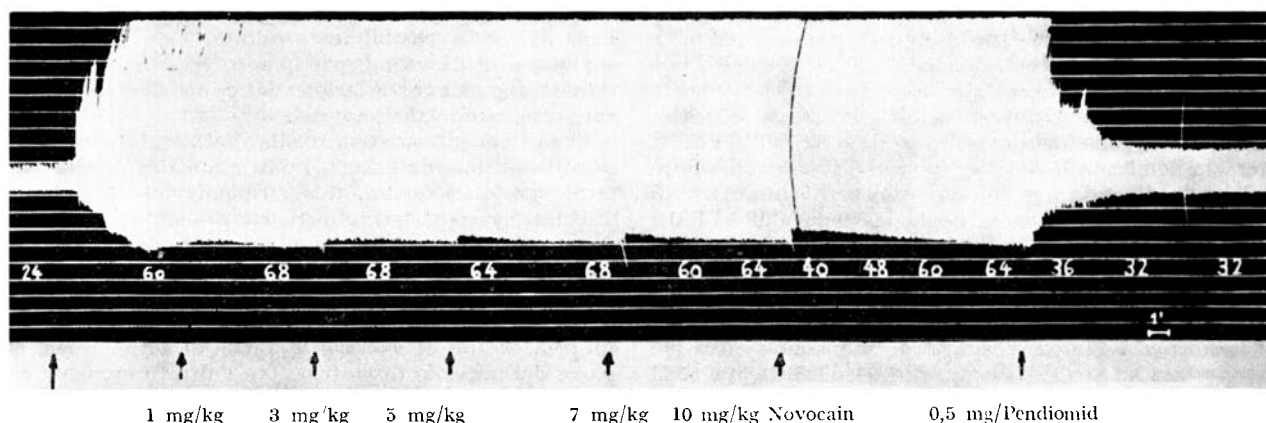


Abb. 4. Katze. Siehe Legende zu Abbildung 2.

Wirkung steigender Dosen von intravenös injiziertem Novocain und von Pendiomid auf die durch eine Embolie (1. Pfeil) veränderte Atmung.

Obwohl das Hexamethonium in der beschriebenen Versuchsanordnung ohne Wirkung blieb, beeinträchtigt es diejenige des Pendiomid. Dieses vermag nach vorheriger Gabe des Hexamethonium nicht mehr, oder erst in weit höheren Dosen als sonst, im geschilderten Sinne zu wirken. Durch weitere Untersuchungen bleibt abzuklären, ob sich das Hexamethonium und das Pendiomid nur in

pathicus and the parasympathicus could therefore not be a decisive factor in the test described; alternatively of the substances tested, certain functional elements of these two systems are affected only by Pendiomide.

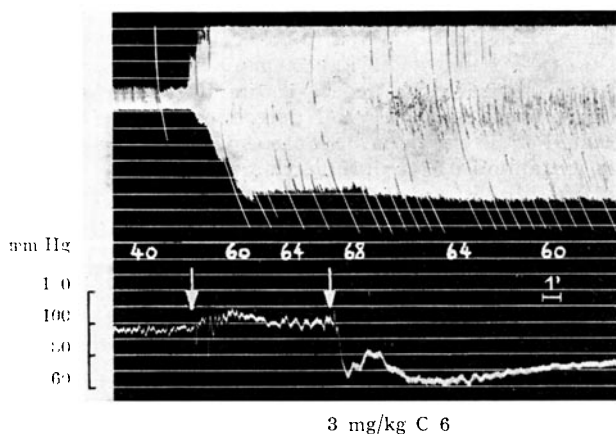


Abb. 5. Katze. Siehe Legende zu Abbildung 2.

Das ganglionär blockierende Hexamethonium wirkt auch in relativ hohen Dosen nicht in gleicher Weise wie das Pendiomid.

dieser Hinsicht oder auch in anderen pharmakologischen Wirkungsqualitäten gegenseitig beeinflussen, ferner ob die Wirkung des Pendiomid möglicherweise auch durch Substanzen mit vom Pendiomid abweichendem chemischem Aufbau und Wirkungstypus verändert werden könnte.

H. J. BEIN

Biologische Abteilung der Ciba, Aktiengesellschaft, Basel, den 15. Oktober 1951.

Summary

The modification of the respiration under consideration, which appear after lung embolism, are not affected by sympathicolitics, parasympathicolitics, by combinations of these two, or by hexamethonium and tetraethylammoniumbromide. They are, however, influenced by the ganglionic blocker, Pendiomide. The efferent sym-

Modificazioni nelle proteine muscolari contrattili del coniglio in corso di avitaminosi E

È noto che il mioplasma delle fibre muscolari è massivamente coinvolto nel processo degenerativo cui questo tessuto va incontro nel corso della avitaminosi E (ALOISI¹). Abbiamo pertanto iniziato uno studio, condotto sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo (per esempio birifrangenza di flusso delle proteine) sulla compagine proteica delle fibre muscolari dei conigli distrofici nel quadro di una indagine più vasta sulla patogenesi della distrofia muscolare da avitaminosi E. In questa Nota vengono riferiti i dati quantitativi sulla estrazione delle varie proteine muscolari.

Modalità sperimentali. 21 conigli furono suddivisi in 3 lotti qualificati nella tabella. La dieta carente in vitamina E da noi usata era una lieve modificazione di quella di HOUGHIN e MATTILL². Al lotto che riceveva la vitamina E questa veniva somministrata per via orale in ragione di 20 mg due volte la settimana.

Gli animali in avitaminosi venivano uccisi a distrofia conclamata, e quelli degli altri lotti dopo un periodo uguale o maggiore di dieta.

La estrazione delle proteine muscolari è stata seguita secondo la tecnica proposta da SZENT-GYÖRGYI³, cioè con una tecnica che è fondamentalmente intesa alla estrazione e purificazione della miosina (miosina solubile in acqua o miosina propriamente detta) lasciando poi un residuo dal quale si può contemporaneamente estrarre l'actina. Questa però, nella maggior parte degli esperimenti, fu estratta seguendo le modificazioni apportate al metodo da FEUER *et al.*⁴.

¹ M. ALOISI, Arch. Anat. Pat. e Med. Clin. 3, 1 (1940); Atti Soc. it. Patol. 2, 284 (1951).

² B. O. HOUGHIN e H. A. MATTILL, J. Biol. Chem. 146, 301 (1942).

³ A. SZENT-GYÖRGYI, Acta physiol. Scand. 9, suppl. 25 (1945).

⁴ G. FEUER, F. MOLNAR, E. PETTKO e F. B. STRAUB, Hung. acta physiol. 1, 150 (1948).

È noto che durante l'estrazione della miosina si ottiene, da principio una frazione precipitabile a pH 6,5 e ad una forza ionica corrispondente a 0,11. È questa una frazione di actomiosina che secondo SZENT-GYÖRGYI rappresenta il contenuto in actina del primo estratto, precipitato come actomiosina ad opera dell'ATP. È verosimile che la quantità di actomiosina ottenibile in tal modo dipenda non solo dalle quantità originarie di miosina e di actina, ma anche dal contenuto di ATP del primo estratto, e questo può variare notevolmente nel muscolo distrofico. Comunque noi abbiamo sempre conservato e purificato questa prima frazione actomiosinica la quale appunto compare nella nostra tabella come *actomiosina*. La miosina rimasta in soluzione veniva poi precipitata ad una forza ionica di 0,04, e lavata in 0,02 M KCl. Tale frazione compare nella nostra tabella come *miosina*. Dopo la precipitazione della miosina rimane una frazione proteica disciolta nel liquido supernatante costituita da varie altre proteine muscolari estraibili nelle suestposte condizioni ed anche da proteine non muscolari passate in soluzione (emoglobina, per esempio). Abbiamo chiamato questa complessa frazione proteica *frazione non contrattile* (f.n.c.). L'*actina*, estratta secondo il metodo citato, veniva controllata per le sue proprietà di legame con diversi anioni e cationi come indicato da SZENT-GYÖRGYI.

Tutte queste frazioni venivano determinate quantitativamente come azoto, per KJELDAHL. Del muscolo veniva determinato il peso secco che ci forniva un altro dato interessante; il contenuto in acqua dei muscoli distrofici il quale è riportato nella letteratura con dati non sempre concordanti.

Risultati. La seguente tabella riporta i valori del contenuto in acqua in per cento di peso fresco e delle varie frazioni proteiche in per cento di peso secco di muscolo nei tre lotti di conigli.

L'esame della tabella dimostra che:

a) i muscoli distrofici hanno un maggior contenuto in acqua rispetto ai conigli normali e a quelli di controllo (riforniti di vitamina E) i quali si comportano in tutto come normali;

b) nei conigli in cui la distrofia è di grado avanzato si ha un abbassamento del contenuto proteico dell'estratto muscolare e tale abbassamento è essenzialmente dovuto a forte diminuzione della actomiosina e a scomparsa della miosina. Va però subito detto che in diversi altri conigli (non riportati nella presente tabella) nei quali la distrofia non aveva ancora raggiunto un grado clinicamente appariscente si riscontrarono valori di actomio-

sina e di miosina variabili e anche vicini al normale, sebbene di regola sensibilmente ridotti;

c) i valori di actina, per quanto meno costanti, non dimostrano alcuna variazione dal punto di vista quantitativo nei tre lotti di animali;

d) nei conigli mantenuti alla dieta sintetica, ma riforniti di vitamina E tutti i dati quantitativi sulle proteine muscolari esaminate corrispondevano al normale.

I dati suesposti potrebbero far pensare che anche in questo caso si tratti di un grado estremo del noto effetto *Deuticke* (inestraibilità della miosina). Ma diverse considerazioni, in parte desunte da altri esperimenti, ci fanno pensare che si verifichi invece qui una vera e propria *perdita di miosina* (e anche di actomiosina) da parte del muscolo distrofico. Tra l'altro, esaminate per il contenuto proteico anche le soluzioni alcaline con cui si estrae successivamente il residuo muscolare per ricavarne l'actina, non vi si è riscontrata, nel caso degli animali distrofici, una maggiore quantità di proteina rispetto ai normali (come sarebbe stato da aspettarsi a titolo di compenso della mancata estrazione a pH 6,5) anzi, se mai, anche qui un minor contenuto proteico.

Sull'importanza dell'ATP nel determinare l'effetto *Deuticke* vi sono molte opinioni. Se quell'effetto fosse dovuto, come voleva ERDÖS¹ alla deficienza di ATP sarebbe da vedere se anche nel nostro caso i risultati avuti non siano da attribuire ad una perdita o diminuita produzione di ATP da parte del muscolo distrofico: ma ricerche eseguite da BONETTI e FRONTALI-TOSCHI² escludono una deficienza notevole nella capacità di sintesi dell'ATP del muscolo distrofico. Del resto DUBUISSON³, CREPAX e HERION⁴ e CREPAX⁵ hanno di recente ripreso questo argomento e negata e diminuita notevolmente l'importanza dell'ATP nel determinare l'effetto *Deuticke*. Per ciò che riguarda il caso specifico della distrofia da avitaminosi E ci ripromettiamo di indagare partitamente su questo punto.

E. BONETTI, M. ALOISI e P. MERUCCI

Centro per lo Studio della Fisiopatologia del C.N.R. presso l'Istituto di Patologia Generale, Università di Roma, il 10 settembre 1951.

¹ T. ERDÖS, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged* 3, 51 (1943).

² E. BONETTI e N. FRONTALI-TOSCHI, *Atti Soc. it. Patol.* 2, p. II, 843 (1951).

³ M. DUBUISSON, *Les protéines musculaires*, Exposés annuels del Bioch. Méd. (Masson, Paris 1948); *Biol. Review* 25, 46 (1950).

⁴ P. CREPAX e A. HERION, *Bioch. et Biophys. Acta* 6, 54 (1950).

⁵ P. CREPAX, *Boll. Soc. ital. Biol. Sperim.* 26, 1485 (1950).

Quantità delle frazioni proteiche estratte dai muscoli di conigli normali e distrofici

Lotti	N° animali	Acqua Percento di peso fresco	I estratto (Forza ionica = 0,66)		Acto- mios'na N mg	Miosina N mg	Actina N mg	N frazione non con- trattile (f. n. c.) mg	N f. n. c. meno N non proteico 1° estrat- to mg
			N totale mg	N non proteico mg					
Conigli a dieta comune . . .	6	77,64 ± 0,78	5075 ± 208	1408 ± 28	576 ± 36	931 ± 63	—	3287 ± 118	1879
Conigli a dieta priva di vitamina E (<i>Distrofia conclamata</i>)	9	81,54 ± 0,62	2669 ± 114	900 ± 56	139 ± 21	assente	395 ± 67	2527 ± 167	1627
Conigli alla stessa dieta + vitamina E	6	79 ± 0,91	4579 ± 243	1366 ± 245	547 ± 67	901 ± 77	352 ± 52	2894 ± 195	1523

I valori di N delle varie frazioni proteiche sono calcolati per cento grammi di peso secco di muscolo.

Summary

Extractions of muscle proteins of dystrophic, vitamin-E deficient rabbits show that in advanced dystrophy the actomyosin content of the extract (ionic strength = 0.11) is considerably reduced. The myosin content is even more reduced and may completely disappear from the extract. Actin, on the other hand, does not seem to be quantitatively effected by the dystrophy. The possible interrelationship between these results and the ATP content of the dystrophic muscles is briefly discussed.

Über Stoffwechselversuche mit radioaktivem Calcium

Im Verlauf von Stoffwechseluntersuchungen zum Karies-Fluor- und zum Rachitisproblem¹ mit Hilfe des radioaktiven Calciumisotops Ca⁴⁵ sind wir zu einigen allgemeineren Ergebnissen gelangt, deren kurze Mitteilung uns hier gerechtfertigt erscheint. Zunächst bedingte die lange Versuchsdauer von 250 Tagen eine ständige Kontrolle der Radioaktivität unserer Präparate, wobei eine neue Bestimmung der Halbwertszeit des Ca⁴⁵ möglich wurde. Es werden hierfür in der Literatur heute noch zwei Werte angegeben, ein älterer von $T = 180$ Tagen (besonders in amerikanischen Veröffentlichungen) und ein neuerer von $T = 152$ Tagen. Unsere Bestimmungen ergeben als Mittelwert $T = 152 \pm 1,5$ Tage, das heißt genau den neueren, von SOLOMON und GLENHEIM² angegebenen Wert. Weiter erfordert die relativ energiearme β -Strahlung des Ca⁴⁵ von $E_0 = 0,254$ MeV eine Absorptionskorrektur für Ca-Präparate endlicher Dicke, die nach der vereinfachten, aber bei weitem genügenden Formel

$$I_{(x)} = I_0 \frac{\mu x}{1 - e^{-\mu x}}$$

durchgeführt werden kann, worin I_0 die Strahlenintensität eines Präparats bestimmter Aktivität bei unendlich dünner Schicht, I_x die Strahlung dieses Präparates bei der Schichtdicke x , und μ den Massenschwächungskoeffizienten der Strahlung bedeuten. Dabei wird für β -Strahlen μ allgemein in cm^2/mg und x in mg/cm^2 gemessen. Die Bestimmung von μ für Ca⁴⁵ in verschiedenen Materialien mit geringer Kernladungszahl ergab, daß die Schwächung der β -Strahlung bei Messung durch ein Zählrohr mit einer Wandstärke von $2 \text{ mg}/\text{cm}^2$ sehr annähernd exponentiell verläuft, mit $\mu = 0,107 \pm 0,002 \text{ cm}^2/\text{mg}$, in sehr guter Übereinstimmung mit dem Wert von 0,105, der kürzlich von COMAR, HANSARD, PLUMLEE und BARRENTINE³ angegeben worden ist. Die Dickenkorrektur macht bei $x = 1 \text{ mg}/\text{cm}^2$ somit ca. 5% des Meßwertes aus.

Das in unseren Versuchen verwendete Ca⁴⁵-Präparat bestand in einer sogenannten «Irradiation Unit» von 16 g CaCO₃, die nach Berechnung aus dem «Pilefaktor» eine spezifische Aktivität von 0,333 mc/g (Millicurie) Ca-Element, entsprechend 2,12 mc Ca⁴⁵ für das Gesamtpräparat, aufwies. Eine eigene Aktivitätsmessung (nach der Methode des festen Raumwinkels) ergab eine Gesamtaktivität von 2,04 mc. Das CaCO₃ wurde in Ca-«Laktobionat» Ca(C₁₂H₂₁O₁₂)₂ übergeführt⁴. Es wurden insgesamt

1070 cm³ einer Ca-Laktobionatlösung erhalten, die zu Beginn der Tierversuche total 5,61 mg Ca mit 1,87 μC (Mikrocurie) Ca⁴⁵ im cm³ enthielt. Diese spezifische Radioaktivität ist für Stoffwechselversuche an Rattenknochen in ihrer Größenordnung gerade ausgezeichnet geeignet, wenn die erhaltenen Knochenpräparate (extrahiertes CaO oder CaCl₂) ein Gewicht von etwa 10 mg aufweisen.

In Übereinstimmung mit früheren Autoren¹, die teilweise mit Sr und Ra gearbeitet haben, wurde gefunden, daß der weitaus größte Teil des vom Tierorganismus aufgenommenen Ca im Knochensystem gespeichert wird, wobei nach ca. 20 Tagen (bei täglicher Ca-Zufuhr) ein Gleichgewicht zwischen aufgenommener und wieder ausgeschiedener Ca-Menge vorhanden ist. Die Aufnahme kann angenähert formuliert werden durch die Funktion:

$$\frac{dM}{dt} = a - bM; \quad M = \frac{a}{b} (1 - e^{-bt}),$$

welche bei größeren Zeiten einem konstanten Grenzwert $M = a/b$ zustrebt. Dieser liegt bei unseren Versuchen für den Incisivus bei etwa 0,6%, beim Molar bei etwa 0,3%, bei der Epiphyse bei etwa 0,8% und bei der Diaphyse bei etwa 0,5% Ca-Element.

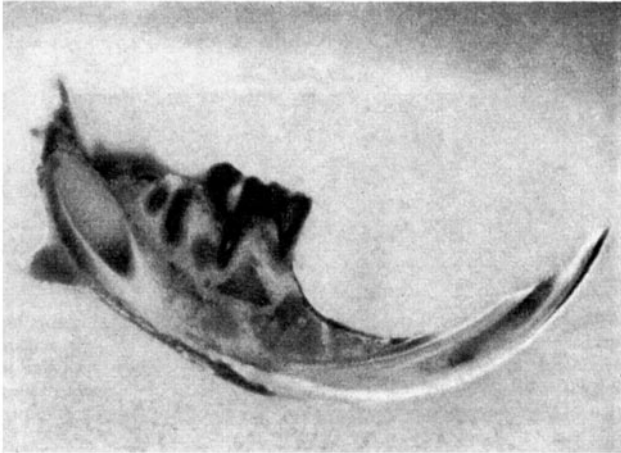


Abb. 1. – Autoradiographie eines angeschliffenen Rattenkiefers auf feinstkörnigem Film nach Verfüterung von Ca⁴⁵. Exposition 30 Tage. Positivkopie, helle Zonen: starke Ca⁴⁵-Ablagerung. Anreicherung besonders in den äußeren Schichten des Incisivus (zonare Struktur) und im Innern der Molaren.

Innerhalb der Knochen und Zähne lagert sich das zugefügte Ca in verschiedenen Zonen in verschiedenen Konzentrationen ab, wie neben dem Verhältnis Epiphyse:Diaphyse sehr schön durch die Autoradiographie eines angeschliffenen Rattenkiefers (Abb. 1) nach 20tägiger Ca-Eingabe gezeigt wird.

Tabelle I
Ca-Gehalt einiger Knochen in Prozent nach Trocknung

	Incisivus	Molar	Epiphyse	Diaphyse
Maximum . .	29,4	28,7	19,7	24,8
Minimum . .	27,5	26,6	14,2	18,3
Mittel . . .	28,5	27,5	16,8	20,2

¹ T. GORDONOFF und W. MINDER, Helv. physiol. acta 9C, 24 (1951); Int. Z. Vitaminforsch. 23, 16 (1951).
² A. K. SOLOMON und L. E. GLENHEIM, Phys. Rev. 73 415 (1948).
³ C. L. COMAR, S. L. HANSARD, M. P. PLUMLEE und B. T. BARRENTINE, Nucleonics 8, 19 (1951).
⁴ Die hierzu notwendige Laktobionsäure sowie die Methodik zur Überführung wurden uns in sehr verdankenswerter Weise von den Herren Prof. A. STOLL und Dr. JUCKER, Basel, zur Verfügung gestellt.

¹ W. CAMPBELL und D. M. GREENBERG, Proc. nat. Acad. Sci. Amer. 26, 176 (1940). – D. M. GREENBERG, Z. biol. Chem. 157, 99 (1945). – W. P. NORRIS und W. KISILEWSKI, Cold Spring Harbour Symposia 13, 164 (1948).