

the rats (100 g) were brought to a state of avitaminosis with the method previously described¹. They were able to withstand the avitaminosis very well for more than 30–35 days. In the case of the adrenalectomized rats, with a shorter survival period, we had to use a different procedure: the rats were adrenalectomized at different phases of the avitaminosis and were then sacrificed 4–6 days after adrenalectomy.

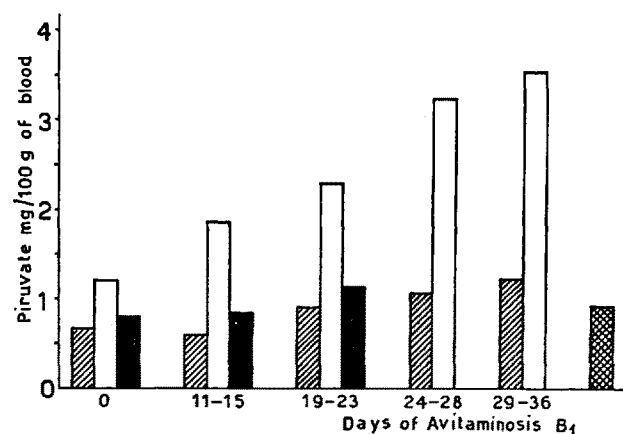


Fig. 1.—Blood Pyruvate of rats in Avitaminosis B₁: not operated, hypophysectomized and adrenalectomized.

- Not operated rats in Avitaminosis B₁ (controls)
- ▨ Hypophysectomized rats in Avitaminosis B₁
- Adrenalectomized rats in Avitaminosis B₁
- ▤ Hypophysectomized rats after 38 days (controls)

The results are shown synthetically in Figure 1. They show that in the hypophysectomized rats there is a B₁ avitaminosis hypopyruvicaemia and that adrenalectomy performed on rats in avitaminosis always causes a marked lowering of the pyruvicaemia. The course of the avitaminosis was followed by determining the Aneurin content of the tissues (brain, muscle, liver), which does not differ substantially from that of the controls. Even in normal rats hypophysectomy and adrenalectomy lower the pyruvate content of the blood.

Complete data will be published elsewhere².

From these results and from what is known on the increase of the pyruvicaemia in states of stress³, or following the injection of cortisone or adrenal extracts in experimental animals⁴, one might conclude that in B₁ avitaminosis the accumulation of pyruvate in the blood may be considered to a certain degree as due to the hyperfunction of the hypophysis-adrenal system.

These results do not exclude the possibility that part of the pyruvate that accumulates in the blood may be derived from a retarded or blocked oxidation of the pyruvate; but we have stated above the consideration that lead us to believe that the interruption or slowing down of the oxidative mechanism comes into play in the

advanced stages of avitaminosis. The hyperpyruvicaemia which accompanies the B₁ avitaminosis is therefore a consequence of both hyperformation due to adrenal hyperfunction and to a slowed process of removal of the pyruvate, that is, it is in part an aspecific metabolic symptom, in part a specific symptom of the avitaminosis.

This interpretation permits us to explain a fact that would otherwise be difficult to explain: that is, the normal utilization of glucides by rats in avitaminosis from 3–4 weeks, when the blood pyruvate is already markedly increased¹.

L. DE CARO and G. RINDI

Institute of Human Physiology, University of Pavia, December 23, 1954.

Riassunto

L'iperpiruvicemia che accompagna l'avitaminosi B₁ (ratto) è da considerarsi come dovuta, almeno in parte, all'iperfunzione del sistema ipofisi-surrene.

¹ L. DE CARO, C. CASELLA, and G. RINDI, *Exper.* 8, 431 (1952).

Freisetzung von Kalium aus denerviertem und innerviertem Skelettmuskel durch Acetylcholin

In einer vorangegangenen Mitteilung konnten wir zeigen, dass nach intravenöser Verabreichung einer Reihe von neuromuskulär wirksamen quartären Ammoniumverbindungen (Succinylbischolin, Dekamethonium und Octamethylenbiscarbaminoylcholin), die eine Depolarisation der Endplattenregion bewirken, Kaliumionen aus der Muskulatur in die Extrazellularflüssigkeit in Freiheit gesetzt werden¹. Die nachstehend mitgeteilten Versuche sollen zeigen, unter welchen Bedingungen und in welcher Größenordnung eine Freisetzung von Kalium aus der Skelettmuskulatur durch Acetylcholin (ACh) erfolgt bzw. wie sich die Empfindlichkeitssteigerung des chronisch denervierten Muskels für ACh in dieser Hinsicht auswirkt.

Die Versuche wurden an Katzen mit isolierter Durchströmung beider hinterer Extremitäten in der gleichen Versuchsanordnung wie bei KLUPP und KRAUPP¹ beschrieben ausgeführt. Eine der beiden Extremitäten wurde dabei jeweils 8 bis 12 Tage vor dem Versuche durch Durchschneidung der N. ischiadicus und femoralis denerviert. Die durchströmten Extremitäten waren in einem Wasserbad von konstanter Temperatur von 37° versenkt. Als Durchströmungsflüssigkeit wurde eine Blut-Tyrode-Verdünnung (durchschnittliche Sauerstoffkapazität: 3,5 Vol%) verwendet. Die Kaliumbestimmungen wurden flammenphotometrisch durchgeführt.

Ergebnisse. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass bei Durchflussgrößen von 10 bis 30 cm³ je Minute und Extremität die spontane Abgabe von Kalium an die Durchströmungsflüssigkeit den geringen Wert von 1 bis 2 µg/min auf der innervierten und von 2 bis 4 µg auf der denervierten Seite beträgt. In diesem Durchflussbereich blieb die arteriovenöse Konzentrationsdifferenz des Kaliums innerhalb des Versuches praktisch konstant, so dass die aus der Muskulatur an die Durchströmungsflüssigkeit abgegebenen Kaliummengen der Durchfluss-

¹ L. DE CARO, C. CASELLA, and G. RINDI, *Exper.* 8, 431 (1952). — G. RINDI, G. FERRARI, and V. PERRI, *Inter. Z. Vitaminforsch.* 25, 210 (1954).

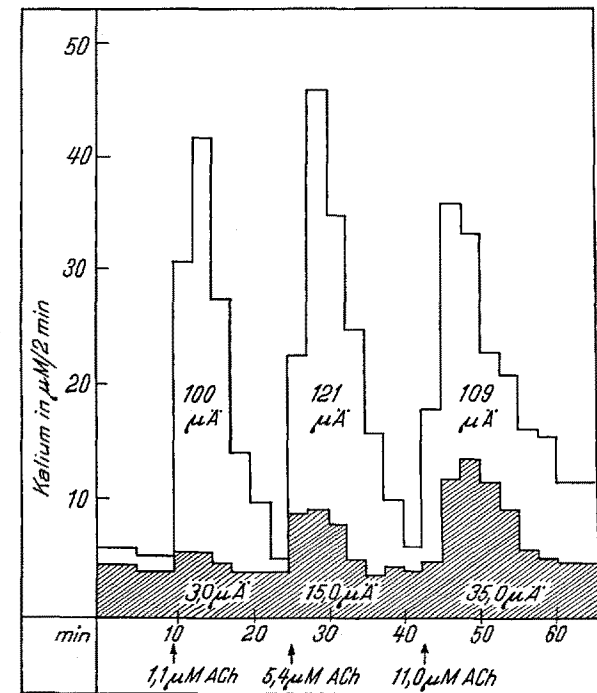
² L. DE CARO, G. RINDI, G. FERRARI, and V. PERRI, *Arch. Sci. Biol.*

³ H. SELYE, *Stress*, Acta In. Montreal 1950, 137.

⁴ G. FERRARI, *Boll. Soc. it. Biol. sper.* 29, 798 (1953).

¹ H. KLUPP, O. KRAUPP, *Arch. Int. Pharmacodyn* 98, 340 (1954).

grösse proportional waren. Dadurch war es möglich, die durch ACh zusätzlich in Freiheit gesetzten Kaliummengen nach Abzug der der jeweiligen Durchflussgrösse entsprechenden Spontanfreisetzung zu bestimmen. In den Ergebnissen der Tabelle sind nur solche Versuche berücksichtigt, bei denen diese Bedingungen erfüllt waren. Grösse und zeitliche Verhältnisse der Kaliumfreisetzung nach intra-artieller ACh Verabreichung sind aus der Abbildung an Hand eines unserer Versuche ersichtlich.



Katze, 3 kg, Chloralosenarkose (80 mg/kg). Kaliumfreisetzung an der innervierten und denervierten Extremität. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Kaliumabgabe der Muskulatur in μM je 2 min; bei $\uparrow$ intraarterielle Injektion von ACh. Die Durchflussgeschwindigkeit war in diesem Versuch für beide Extremitäten gleich. Die angegebenen ACh-Dosen gelten für innervierte und denervierte Extremität und geben die tatsächlich je Extremität zugeführte ACh-Menge an. Ausgefüllte Felder: innervierte Extremität; leer umrandete Felder: denervierte Extremität.

Die aus einer Reihe solcher Versuche bestimmten Absolutwerte der zusätzlichen Kaliumausschüttung nach verschiedenen Dosen von ACh sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Zusatz von *d-Tubocurarin* (dTC) in einer molaren Konzentration von 10^{-5} zur Durchströmungsflüssigkeit führte am innervierten Muskel zu einer völligen Unterdrückung der Kaliumausschüttung selbst bis zu einer Dosis von $53 \mu\text{M}$ ACh. Am denervierten Muskel wurde die Kaliumausschüttung bei Durchströmung mit 10^{-5} dTC in einem Dosenbereich von $0,52$ bis $10,5 \mu\text{M}$ ACh auf durchschnittlich 12% der Werte ohne dTC herabgesetzt.

Unter *Eserin* (molare Konzentration in der Durchströmungsflüssigkeit: 10^{-7}) wurde die Kaliumausschüttung an der innervierten Extremität nach Dosen von $0,95$ bis $1,20 \mu\text{M}$ ACh auf das 5- bis 6fache, an der denervierten Extremität im selben Dosenbereich von ACh hingegen nur um rund 20% gesteigert.

Weitere Versuche ergaben, dass die Unterschiede in der Kaliumfreisetzung zwischen innervierter und denervierter Extremität verschwinden, wenn nur ein dreitägiges Intervall zwischen Denervierung und Versuchen eingehalten wurde.

Besprechung der Versuchsergebnisse. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass in dem untersuchten Dosenbereich die Beziehung zwischen ACh-Dosis und -Menge an freigesetztem Kalium für den denervierten und innervierten Muskel weitgehend verschieden ist. Neben dem grossen Unterschied in den Schwellendosen ($0,84 \mu\text{M}$ innervierte Extremität, $0,01 \mu\text{M}$ denervierte Extremität) fällt vor allem die starke Abhängigkeit der molaren Relation ACh-Dosis zu freigesetztem Kalium an der denervierten Extremität ins Auge, während dieses Verhältnis an der innervierten Extremität über mehr als eine Zehnerpotenz der ACh-Dosen eine vergleichsweise sehr geringfügige Abnahme mit Erhöhung der ACh-Dosis zeigt. Was nun den anatomischen Ort des Kaliumaustrittes anbetrifft, so muss hier in erster Linie an die Endplattenregion gedacht werden, da diese am innervierten¹ und denervierten Muskel² um vieles empfindlicher für die depolarisierenden Wirkungen des ACh als die Muskelmembran ist. Hicfür spricht auch die Tatsache, dass die von uns beobachtete Kaliumfreisetzung durch dTC weitgehend unterdrückt werden konnte. Unter der Annahme einer Gesamtzahl von 10^6 Endplatten je Extremität³ ist nach den Ergebnissen der Untersuchungen von FATT und KATZ⁴ und ACHESON⁵ bei maximaler Depolarisation durch ACh ein Gesamt-

1 S. W. KUFFLER, J. Neurophysiol. 6, 99 (1943).

2 J. G. NICHOLS, J. Physiol. 123, 2P (1954).

3 J. C. ECCLES, The neurophysiological Basis of Mind (Clarendon press, Oxford 1953), S. 78.

4 P. FATT und B. KATZ, J. Physiol. 115, 320 (1951).

5 G. H. ACHESON, Fed. Proc. 7, 447 (1948).

Innerviertes Bein			Denerviertes Bein		
ACh Dosis in μM	Kalium in μM	molares Verhältnis ACh: Kalium	ACh Dosis in μM	Kalium in μM	molares Verhältnis ACh: Kalium
0,024	0	—	0,020	14,6	1:730
0,053	0	—	0,035	25,9	1:740
0,115	0	—	0,106	49,2	1:464
0,244	0	—	0,199	50,3	1:252
0,580	0	—	0,520	76,1	1:146
0,840	3,4	1:4,00	1,37	97,6	1:71
3,90	11,5	1:2,95	5,52	130,0	1:23
5,52	17,0	1:3,00	6,45	108,0	1:16
11,35	29,2	1:2,56	10,70	143,2	1:13
18,20	39,1	1:2,15	13,45	114,6	1:8

ionenstrom von $3 \cdot 10^{-8}$ Mol je m/s durch sämtliche Endplatten einer Extremität zu erwarten. Wenn wir ein Drittel dieses Ionenstromes dem Kalium zuordnen und berücksichtigen, dass die Dauer der Endplattendepolarisation nach intraarterieller Injektion von 25 bis 50 μg ACh am Musculus gracilis der Katze mehrere Sekunden beträgt¹, so liegt der daraufhin zu erwartende Kaliumaustritt in der Grössenordnung von 10^{-4} bis 10^{-5} Mol und stimmt mit der von uns am denervierten Muskel experimentell bestimmten Kaliumfreisetzung gut überein. Die weitgehend lineare Abhängigkeit der Kaliumausschüttung von der ACh-Dosis am innervierten Muskel möchten wir vorläufig damit erklären, dass die Diffusion von ACh aus dem Extrazellulärfluid in den Raum zwischen den terminalen Nervendigungen und der Endplattenmembran als limitierender Vorgang für Konzentrationshöhe und Verweildauer des ACh an der Endplatte in Erscheinung tritt. In gleichem Sinne würde auch die weitaus grössere Empfindlichkeit sowie der exponentiell anklingende und einem Sättigungswert zustrebende Verlauf der Kaliumausschüttung in Abhängigkeit von der ACh-Dosis am denervierten Muskel für einen Wegfall dieses Diffusionsvorganges durch Degeneration der neuralen Anteile der Endplattenkammer sprechen.

W. KOBINGER, O. KRAUPP,
H. STORMANN und G. WERNER

Pharmakologisches Institut der Universität Wien, den
15. Januar 1955.

Summary

Both hind limbs of cats (one being normally innervated, the other 8–12 days after denervation) were perfused and the quantities of potassium liberated from the two limbs in response to intraarterial injections of varying amounts of acetylcholine were compared by collecting the venous outflow from both sides separately; considerably larger quantities of potassium were found to be liberated from the denervated than from the innervated muscle after equal doses of ACh; the threshold dose of ACh for eliciting a measurable liberation of potassium being much lower on the denervated side. The dose response relation between injected ACh and potassium-liberation is of a different nature for innervated and denervated muscle. The results obtained are compatible with expectations derived from the "short circuit theory" of the transmitter action on the neuromuscular endplate (FATT and KATZ). The reasons of the difference in the dose relations for the innervated and denervated muscle are discussed.

¹ B. D. BURNS und W. D. M. PATON, J. Physiol. 115, 41 (1951).

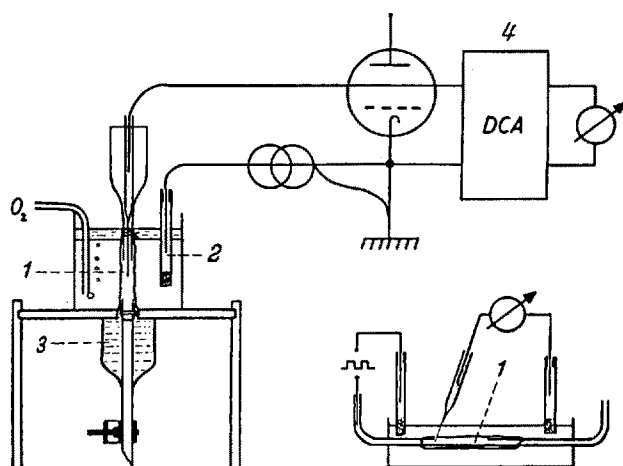
Measurement of the Potential Difference Across the Connective Tissue Sheath of Frog Sciatic Nerve

There is evidence that the connective tissue sheath of a nerve trunk restricts the passage of ions (e.g.¹). The aim of the present work was to find out whether the sheath resembled other membranes such as the frog skin² in yet another respect, in their ability to build up a potential difference by the operation of an active ion "pump".

¹ K. KRNEVIC, J. Physiol. 123, 338 (1954). – A. M. SHANES, J. Cell. Comp. Physiol. 43, 87 (1954); 99 (1954).

² H. H. USSING and K. ZERAHN, Acta Physiol. Scand. 23, 110 (1951).

The longest unbranched part of the frog sciatic was used. A simple way of obtaining a sheath in its normal position was to draw the fibers out of the nerve against each other from either end until the sheath was left free. The sheath was then tied at one end to a small glass funnel through which a 3M KCl microelectrode could be introduced, and at the other end to a polyethylene tube, so that solutions inside the sheath could be rapidly changed. It was placed vertically in the bath as shown in the figure with a layer of paraffin oil covering each binding, to prevent possible short circuiting. The potential inside this "sausage" was measured against an indifferent electrode in the bath. "Inside-out" preparations were obtained by drawing the sheath back over the nerve¹.



Arrangement for measuring sheath potential. 1 Nerve sheath; 2 Ringer bath; 3 Paraffin oil; 4 Cossor DC Amplifier. Inset: Arrangement for measuring sheath resistance.

To measure the electrical resistance the sheath was drawn over a polyethylene tube with a longitudinal slit (Figure inset). A square wave of constant current was applied between the inside of the polyethylene tube and the Ringer bath. A 3M KCl microelectrode was inserted into the "sausage" in order to measure the voltage changes produced by current flow. Cable equations were used to calculate the resistance of the sheath² (case 1).

With Ringer solution on either side, the potential difference across the sheath had values of a few mV, not exceeding a limit of 10 mV. (Outside was negative to inside when "right side out," and inside negative to outside when "inside out".) The absence of any considerable potential difference might be due to damage done to the sheath during dissection. Therefore, with three "sausages", the electrical resistance of the sheath was measured and found to be of the order of $500 \Omega \text{cm}^2$. The space constant (distance from leading-in electrode at which amplitude of potential change drops by a factor e) had values between 2 and 3 mm. This result roughly corresponds to electrical data obtained for the sheath of intact frog nerve³ (Fig. 6), suggesting that no considerable damage was done to the sheath in the process of removing the nerve fibers. However, it also follows that any "pump" displacing net electric charge across the

¹ F. CRESCITELLI and T. A. GEISSMAN, Amer. J. Physiol. 164, 2, 509 (1951).

² S. WEIDMANN, J. Physiol. 118, 348 (1952).

³ C. RASHBASS and W. A. H. RUSHTON, J. Physiol. 110, 110 (1949).