

be observed also in some subjects treated with dicoumarin derivatives, it is not yet possible to establish the value of such an interpretation.

P. DE NICOLA

Department of Medicine, University of Pavia, November 15, 1951.

Zusammenfassung

Der Einfluß hoher Plasmakonzentrationen auf die Blutgerinnung wurde während der Behandlung mit Dikumarinderivaten und bei anderen Krankheitszuständen untersucht. Eine einfache Methode zur klinischen Auswertung solcher Ergebnisse wird vorgeschlagen. Es wird die Möglichkeit besprochen, durch solche Methoden zirkulierende Antikoagulantien zu bestimmen.

Research on the Proliferation Activity of Erythroblasts at Low Atmospheric Pressure

It is now an established fact that when living under conditions of low atmospheric pressure animals (as well as human beings) show an increase in erythrocytes and haemoglobin (BERT¹, VIAULT², BARCROFT³, SEYFARTH⁴, MONGE *et al.*⁵, WOLFER⁶, HURTADO⁷, HEILMEYER *et al.*⁸, KRUPSKY and ALMASY⁹, TALBOTT and DILL¹⁰, HURTADO *et al.*¹¹, FARBER¹², VERZÁR¹³, ROBLES and GONZALES¹⁴, GRANDJEAN¹⁵, MERINO¹⁶, LAWRENCE¹⁷). The general assumption is that this hyperglobulia is due to the enhanced erythroblastic activity of the bone marrow, rather than to a decreased hemocatheresis. Such an assumption is supported by the finding of a peripheral reticulocytosis (SEYFARTH⁴, WOLFER⁶, BARCROFT³, HEILMEYER *et al.*⁸, KRUPSKY and ALMASY⁹) and, even more, of a medullary erythroblastosis (SCHACKE and McDUPPE¹⁸, REISSMANN²⁰). From these findings most authors infer that hypoxia may act as a stimulant of erythropoiesis. According to such a concept, polyglobulia would be the ultimate condition brought about by the following gradual stages: hypoxia of the surrounding atmosphere → hypoxemia (peripheral) → medullary hypoxia → erythropoiesis enhanced by hypoxia → polyglobulia.

Some facts, however, seem to be inconsistent with such an assumption.

First of all, ROSIN and RACHMILEWITZ¹ have noted that in bone marrow cultures *in vitro* the mitotic index decreases as the O₂ tension decreases. Under similar conditions, MAGNUSSEN² observed a decrease in erythrocyte formation. BULLOUGH³, as well as ASTALDI *et al.*⁴ noticed that under anoxaemic conditions, the cells do not enter mitosis, although the mitoses, which are already under way, continue to cytodieresis. GRANT and ROOT⁵ have observed a normal O₂ saturation of medullary blood in some cases of enhanced erythropoiesis. VANNOTTI and MARKWALDER⁶ as well as VERZÁR⁷, reported that polyglobulia under low atmospheric pressure is preceded by an increase in erythrocyte destruction, and consequently assumed that the stimulus toward erythropoiesis may be due to the products of erythrocytosis, rather than to an O₂ decrease at the marrow level. Finally, REISSMANN⁸ showed that polyglobulia occurs not only in the animal under low atmospheric pressure, but also in an animal under normal atmospheric pressure when it is parabiotically connected through a tissular ear-tail anastomosis with the animal under low atmospheric pressure. This phenomenon is explained by REISSMANN assuming that erythro-stimulating substances (erythropoietins) are formed in the animal under low pressure as a consequence of hypoxia, and that such substances pass through the anastomosis to the other animal.

In our opinion, all the foregoing facts are markedly inconsistent with the assumption that hypoxia may by itself be able directly to stimulate erythropoiesis, as most haematologists think. Consequently we felt that the problem was worth examining from various standpoints, and this paper is a report on the functional activity shown by bone marrow surviving under low atmospheric pressure, with special reference to the proliferation activity of erythroblasts of human bone marrow.

The Astaldi-Mauri stathmokinetic test has been used to determine the amount of proliferation. Such a test consists in transplanting bone marrow fragments to a plasma culture containing optimum concentration of colchicine. Owing to the stathmokinetic effect of colchicine, all the cells entering mitosis are arrested in the pre-metaphase, whereby the amount of proliferation activity can be inferred from the number of mitosis occurring in a given period of time (stathmokinetic index).

This research has been carried out on the bone marrow (from the sternum) of 10 subjects suffering from secondary anaemia, in order to obtain a marrow rich in erythroblasts. The culture medium was composed as follows: 1.4 cm³ plasma taken from the marrow donor himself (this plasma had been obtained as fluid by the addition of 10 A.U. of heparin per cubic centimeter blood); 0.2 cm³ of 1/50 000 colchicine in Tyrode solution; 0.4 cm³ of 1/500 protamin sulphate. Protamin, which neutralizes the heparin, making possible the coagulation of plasma (ASTALDI and FRANKO, 1950), had been used to coagulate the culture medium, and should therefore be added just before transplanting.

By using a particular culture apparatus, the bone marrow of each subject has been explanted under the

¹ P. BERT, *La Pression barométrique* (Recherches de physiologie expérimentelle) (G. Masson, Paris 1878), 1168 pp.

² E. VIAULT, C. r. Acad. Sci. 122, 295 (1891).

³ J. BARCROFT *et al.*, Philos. Tr. Roy. Soc. 211, 351 (1923).

⁴ C. SEYFARTH, Klin. Wschr. 6, 487 (1927); Fol. haemat. 34, 7 (1927).

⁵ C. MONGE *et al.*, see in C. MERINO, Blood 5, 1 (1950).

⁶ R. WOLFER, Festschrift Schweiz. Naturforsch. Ges. (1929).

⁷ A. HURTADO, Amer. J. Physiol. 200, 487 (1932).

⁸ L. HEILMEYER *et al.*, Z. exper. Med. 90, 573 (1933).

⁹ H. KRUPSKY and C. ALMASY, Helv. med. acta 4, 94 (1937).

¹⁰ J. H. TALBOTT and D. B. DILL, Amer. J. Med. Sci. 192, 26 (1936).

¹¹ A. HURTADO, Rev. Med. Peruana 2, 3 (1937).—A. HURTADO *et al.*, Arch. Int. Med. 75, 284 (1945).

¹² B. FARBER, Ref. Dtsch. Gesundheitswesen 22, 711 (1946).

¹³ F. VERZÁR, Schweiz. med. Wschr. 77, 6 (1947).

¹⁴ J. ROBLES and T. GONZALES, Blood 3, 660 (1948).

¹⁵ E. GRANDJEAN, Schweiz. med. Wschr. 79, 515 (1949).

¹⁶ C. F. MERINO, Blood 5, 1 (1950).

¹⁷ J. H. LAWRENCE, III^e Congr. Soc. Int. Europ. d'Hématologie, Rome (1951).

¹⁸ J. BARCROFT, *The respiratory function of the blood*, Deutsch von R. FELDBERG. Teil I, Berlin (1927); Teil II, Berlin (1929).

¹⁹ J. A. SCHACK and R. C. McDUPPE, Science 110, 259 (1949).

²⁰ K. R. REISSMANN, Blood 5, 372 (1950).

¹ A. ROSIN and M. RACHMILEWITZ, Blood 3, 165 (1948).

² J. D. MAGNUSSEN, Acta Pharmacol. Toxicol. 5, 153 (1949).

³ W. S. BULLOUGH, Nature 195, 493 (1950).

⁴ G. ASTALDI, G. LACROIX, and C. SACCHETTI, Miner. Med. Leg. 70, 144 (1950).

⁵ W. C. GRANT and W. S. ROOT, Amer. J. Physiol. 150, 618 (1947).

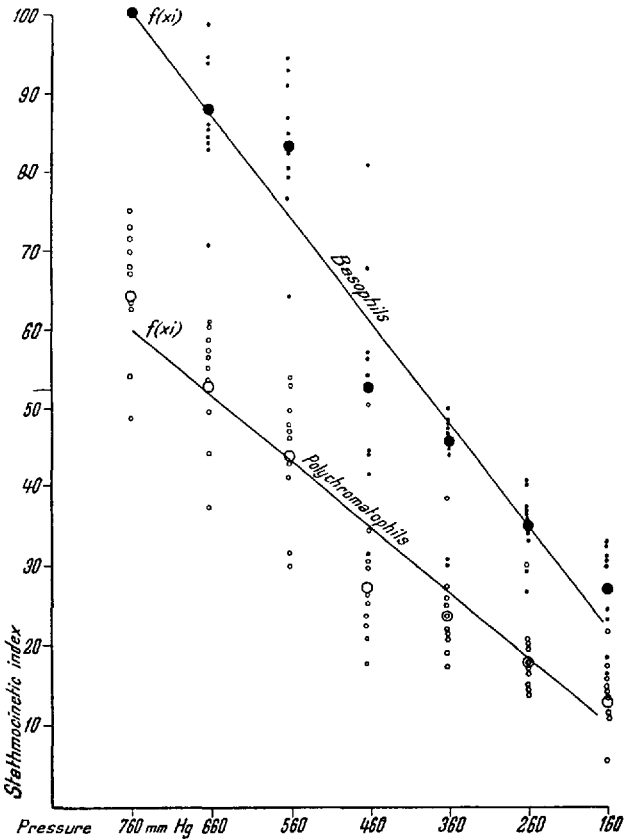
⁶ A. VANNOTTI and H. MARKWALDER, Z. exper. Med. 105, 1 (1939).

⁷ F. VERZÁR, Schweiz. med. Wschr. 77, 6 (1947).

⁸ K. R. REISSMANN, Blood 5, 372 (1950).

following pressure levels: 760, 660, 560, 460, 360, 260, 160 mm/Hg.

The amount of proliferation under these conditions was separately determined for the basophile and polychromatophile erythroblasts.



The stathmokinetic index in basophils at 760 mm. Hg is considered equal to 100.

The diagram reports the stathmokinetic indices of the cases considered, obtained after 12 hours under the various pressure levels; it should be noted that these indices are expressed as percentages of the stathmokinetic index (= 100) of the basophile erythroblasts under normal (760 mm/Hg) pressure.

The following table summarizes the average stathmokinetic indices obtained under different vacuum values, as compared with the proliferation activity of the basophile erythroblast under normal (760 mm) pressure, such an activity being assumed to be = 100.

By analysing the variation with three different criteria (subjects, differentiation phase, degree of pressure), we have been able to show that:

(I) The proliferation activity in the various cases considered undergoes a significant variation, which is to be related with a biological variability from individual to individual.

(II) The proliferation activity of basophile erythroblasts is significantly different, viz. higher, than that of polychromatophiles.

(III) On the contrary, no significant variations are noted from case to case in the ratio of proliferation values of the two erythroblasts differentiation phases (basophile and polychromatophile).

(IV) There are significant variations in the proliferation activity of the erythroblasts at the different pressure levels.

(V) The response of basophile erythroblasts to pressure variations is significantly different from that of polychromatophile erythroblasts, as in the latter an increased vacuum causes a heavier reduction of proliferation than in the case of basophile erythroblasts.

An investigation was also carried out on the quantitative relation between the lowering of the pressure and the decrease in erythroblast proliferation activity, viz., on the law according to which the proliferation varies as a function of vacuum degree. For this purpose, we have interpolated the average stathmokinetic indices of the basophile and those of the polychromatophile erythroblasts. The diagram shows that these lines follow a lineal pattern, the function obtained being

$f(xi) = 62.1 + 0.13 (xi - M)$ for the basophile, and
 $f(xi) = 35.3 + 0.08 (xi - M)$ for the polychromatophile.

To summarize, the results of our investigation show that, in both basophile and polychromatophile erythroblasts, proliferation activity decreases with the progressive decrease of pressure. Consequently, it seems that not only does hypoxia, when acting directly on bone marrow, fail to stimulate erythropoiesis, but in fact it inhibits it. This observation may prompt us to admit that polyglobulia in subjects submitted to low atmospheric pressure is not due to a decrease of O_2 tension at the bone marrow level, and to assume that this phenomenon is rather a reaction to the effect of hypoxia on the biological complex of the organism as a whole, and that such a reaction is responsible for the stimuli which enhance erythropoiesis.

G. ASTALDI, E. BERNARDELLI, and G. REBAUDO

Department of Internal Medicine, University of Pavia, October 16, 1951.

Pressure	Proliferation			
	Basophile Erythroblasts		Polychromatophile Erythroblasts	
	Mean $m \pm \sigma_m$	Dispersion $\sigma \pm \sigma_\sigma$	Mean $m \pm \sigma_m$	Dispersion $\sigma \pm \sigma_\sigma$
760 mm/Hg	100 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	64.6 $\pm$ 2.51	7.94 $\pm$ 1.77
660 mm/Hg	88.4 $\pm$ 3.13	9.90 $\pm$ 2.21	53.3 $\pm$ 2.25	7.13 $\pm$ 1.59
560 mm/Hg	83.3 $\pm$ 2.68	8.47 $\pm$ 1.89	44.3 $\pm$ 2.36	7.48 $\pm$ 1.67
460 mm/Hg	52.8 $\pm$ 4.22	13.34 $\pm$ 2.98	28.1 $\pm$ 2.76	8.75 $\pm$ 1.95
360 mm/Hg	45.9 $\pm$ 2.28	7.21 $\pm$ 1.61	24.2 $\pm$ 1.77	5.61 $\pm$ 1.25
260 mm/Hg	35.1 $\pm$ 1.29	4.08 $\pm$ 0.91	18.7 $\pm$ 1.39	4.42 $\pm$ 0.98
160 mm/Hg	27.2 $\pm$ 1.86	5.88 $\pm$ 1.31	14.0 $\pm$ 1.21	3.83 $\pm$ 0.85

Résumé

Les auteurs ont étudié l'activité proliférative des érythroblastes dans des cultures de moelle osseuse *in vitro* soumises à des pressions atmosphériques variables. Ils ont constaté que l'activité proliférative décroît parallèlement à la chute progressive de la pression. Ils ont en outre noté que dans les limites expérimentales considérées (760–160 mm/Hg) les deux variables (niveau de pression et degré de prolifération) ont une marche linéaire. Ceci démontre que la polyglobulie apparaissant chez les sujets soumis à une dépression barométrique n'est pas due à la diminution de la tension d'oxygène directement au niveau de la moelle osseuse, mais doit être considérée plutôt comme une réaction que l'hypoxie provoque sur le complexe biologique de l'organisme dans son ensemble.

Eine Methode zur Messung der Lebensdauer der Granulozyten beim Menschen

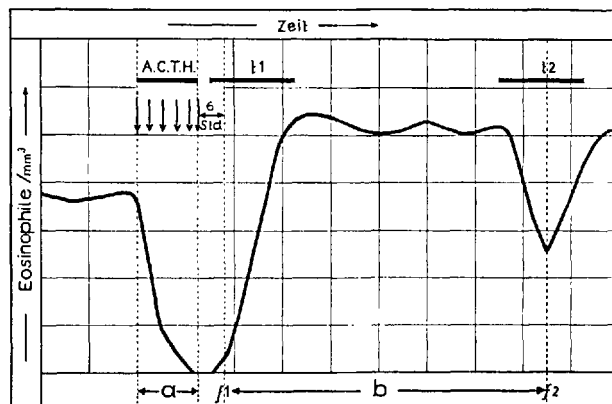
Zur Bestimmung der Lebensdauer der menschlichen Granulozyten wurden verschiedene Methoden vorgeschlagen, welche voneinander ziemlich abweichende Werte ergeben. Die Lebensdauer der ausgeschwemmten Granulozyten wird je nach der angewandten Methode mit 2–6 Tagen angegeben. Bei einer Ausreifungszeit der Granulozyten im Knochenmark von 8–10 Tagen ergibt sich eine Gesamtlebensdauer von 10–16 Tagen.

Eigene Beobachtungen über die Wirkung des adrenokortikotropen Hormons (ACTH.) auf das Blut und die blutbildenden Organe führten uns zu folgenden Überlegungen: Wird mit einem bestimmten Agens innerhalb der Zeit a der grösste Teil der im Blute zirkulierenden Granulozyten zerstört, so übt bekanntlich das Zelldefizit auf das Knochenmark einen intensiven Neubildungsreiz aus. Dadurch wird im Rahmen einer kompensatorisch überschüssigen Regeneration innerhalb der Zeit t_1 der Zellverlust wieder wettgemacht. In dieser Regenerationszeit wird gegenüber normalen Verhältnissen ein Vielfaches an Zellen produziert. Nach Ablauf deren Lebensdauer muss zwangsläufig innerhalb der Zeit t_2 ein vermehrtes Absterben dieser Zellen stattfinden, welches sich bei fortlaufender Zählung in einer Verminderung der betreffenden Zellart im Blute äussert. Das Zeitintervall b zwischen dem Zeitpunkt des Aufhörens der Wirkung des zellzerstörenden Agens (f_1) und dem Maximum der während der Zeit t_2 beobachteten Zellzahlverminderung (f_2) entspricht der Gesamtlebensdauer der betreffenden Granulozytenart (s. Abb.).

Gelingt es, den soeben geschilderten Vorgang auszulösen, so verfügt man über eine Methode zur Messung der Lebensdauer der Granulozyten. Folgende Bedingungen müssen aber erfüllt sein: das zellzerstörende Agens darf die Bildung der Blutzellen im Knochenmark in keiner Weise beeinträchtigen. Die Anzahl der zu untersuchenden Zellen im Blute muss bei Versuchsbeginn gross sein. Nur dann wird das entstehende Zelldefizit genügen, um einen intensiven Neubildungsreiz auszulösen, der innerhalb einer kurzen Regenerationszeit (t_1) eine so grosse Produktion von Zellen zur Folge hat, dass deren gleichzeitiges Absterben durch fortlaufende Zählungen erfasst werden kann. Schliesslich müssen während der ganzen Beobachtungsdauer in bezug auf Zellverbrauch konstante Bedingungen herrschen.

Das für diese Messungsmethode erforderliche Zelldefizit kann für die eosinophilen Granulozyten durch das ACTH. erzielt werden, welches bekanntlich eine Blut-

cosinopenie auslöst und, wie wir in anderen Untersuchungen zeigen konnten, die Bildung der Blutzellen im Knochenmark nicht beeinflusst. Im Anschluss an diese artifizielle Eosinopenie tritt eine starke Regenerations-eosinophilie auf. Nach Ablauf der Zeit b , die der Gesamtlebensdauer entspricht, beobachtet man infolge des gleichzeitigen Absterbens der in der Regenerationsphase vermehrt gebildeten Eosinophilen eine «Ausgleichseosinopenie».



In unseren Untersuchungen wurden die Eosinophilen zweistündlich mit der Phloxinmethode nach RANDOLPH gezählt. Die Menge ACTH., die erforderlich war, um bei den ausgewählten Personen die Eosinophilen aus dem Blute zum Verschwinden zu bringen, betrug 175–425 mg. Bekanntlich ist die Wirkung des ACTH. nach 6 Stunden abgeklungen. Die Gesamtlebensdauer der Eosinophilen entspricht somit dem Zeitintervall zwischen dem Zeitpunkt 6 Stunden nach der letzten ACTH.-Injektion (f_1) und dem tiefsten Punkt der «Ausgleichseosinopenie» (f_2). Sie beträgt bei unseren Untersuchungen rund 6 Tage.

In umgewandelter Form dürfte diese Methode auch zur Messung der Gesamtlebensdauer der neutrophilen Granulozyten angewandt werden. Gleichzeitig mit einer Bluteosinopenie verursacht nämlich das ACTH. einen starken Anstieg der Neutrophilen. Entsprechend dieser vermehrten Bildung muss nach Ablauf einer bestimmten Zeit auch ein vermehrtes Absterben dieser Granulozytenart stattfinden, welches bei fortlaufender Zählung als «Ausgleichsneutropenie» imponieren wird. Die Gesamtlebensdauer wird dann durch das Zeitintervall zwischen dem Zeitpunkt des Beginnes der ACTH.-Verabreichung und dem tiefsten Punkt der «Ausgleichsneutropenie» gegeben.

A. F. ESSELLIER und K. WAGNER

Medizinische Universitätsklinik Zürich, den 3. Dezember 1951.

Summary

A method to determine the life-span of the granulocytes in man with A.C.T.H. is described. Using this method the total life-span of the eosinophils is about 6 days.

Der Einfluß einiger antirheumatischer Substanzen auf Gewebsenzyme

Über die wahrscheinlich vorhandenen Wirkungen antirheumatischer Substanzen auf den Zellstoffwechsel ist bisher wenig bekannt.