

Wir haben sodann die gleichen Patienten einer längeren Behandlung mit Heparin unterzogen, indem wir das Mittel in einer Dosis von 250 mg pro Tag in drei Teilinjektionen intravenös verabreichten. In sämtlichen Fällen stellten wir eine Zunahme der Hauttemperatur der Hände und eine verminderte Frequenz der Anfälle fest, welche auch geringere Dauer und Intensität aufwiesen als vor der Behandlung.

Bei 10 gesunden Kontrollpersonen haben wir die Handwurzel- und Mittelhandtemperatur vor und nach der intravenösen Verabreichung von 250 mg Heparin gemessen: die Zunahme der Hauttemperatur war bei diesen Fällen weniger konstant und vor allem von geringerem Umfang und geringerer Dauer als bei den Raynaud-Patientinnen.

Abgesehen von dem mit Sicherheit nachgewiesenen Unterschied zwischen der normalen Gefässreaktionsfähigkeit und der eines mit Raynaudscher Krankheit behafteten Individuums ist die wahrscheinlichste Erklärung des obigen Ergebnisses darin zu suchen, dass beim normalen Individuum die Hauttemperatur schon unter normalen Bedingungen recht hoch ist; in der Tat erzielt man, wenn man bei Raynaudfällen diesen Versuch in der heissen Jahreszeit durchführt, ungleich weniger ins Auge fallende Resultate.

Aus unseren Experimenten geht also hervor, dass Heparin zum mindesten bei Raynaudfällen den Arterienkrampf lösen und eine erhebliche gefässerweiternde Wirkung ausüben kann.

Die günstigen Resultate einer Heparintherapie bei funktionellen, aber auch bei organischen Arterienerkrankungen lassen sich nach unserer Ansicht und auf Grund unserer Untersuchungen besser durch die festgestellten vasodilatierenden Eigenschaften des Heparins erklären als wenn man nur seine antikoagulierende Wirkung in Betracht zieht.

E. STORTI, F. VACCARI und
G. SCARDOVI

Istituto Patologia Medica, Università Modena, den 28. November 1953.

Summary

In 3 female patients with RAYNAUD's disease affecting the upper extremities, the skin temperature and plethysmographic measurements of the fingers were taken before and after the *i.v.* injection of 250 mg heparin (Liquemin "Roche"). The vasomotor effect thus observed was expressed by increase in skin temperature, pulse frequency and arterial supply, and also by decrease in duration and severity of experimentally induced ischemic attacks. After prolonged treatment with 250 mg heparin *i.v.* daily, the skin temperature increased and the attacks decreased in frequency, duration and severity.

These favorable results in functional arterial disorders are attributed to the established vasodilating action of heparin.

Beitrag zur Frage der Eisenresorption

Die Resorption aus dem Darm nach Verabreichung der Antibiotika wird wegen Vernichtung der Flora im Darmkanal zu einem immer schwereren Problem. Uns interessierte die Eisenresorption, die bekanntlich von einem besonderen Mechanismus reguliert wird, damit es nicht zu einer Überschwemmung mit diesem Metall kommt.

Wir stellten uns die Frage, ob 1. die Eisenresorption aus dem Darmkanal in einer anderen Weise vonstatten geht, wenn dieser steril ist, und 2. welchen Einfluss die normale Flora auf diese Resorption ausübt.

Kaninchen (1500–3000 g) erhielten täglich 30 mg Terramycin + 25000 I.E. Penicillin *per os*. Bakteriologische Stuhlkontrollen zeigten schon nach 3–4 Tagen ausser *Proteus vulgaris* einen negativen Bakterienbefund. Solchen Kaninchen wurde 30 mg/kg FeSO₄ verabreicht. Nach 18 h zeigte die Serumanalyse auf Eisen, dass dieses nicht resorbiert wurde. Nachdem denselben Kaninchen eine grössere Menge Blut entnommen und die Anämie durch eine weitere Kontrolle des Serumeisens festgestellt wurde, bekamen sie dann nach 2 Tagen dieselbe Dosis FeSO₄, doch kam es auch dann nicht zu einer Resorption. Wenn die Verabreichung der Antibiotika ausbleibt, so tritt bei denselben Kaninchen nach einigen Tagen, während welchen sich die normale Darmflora wieder entwickelte, eine Resorption des verabreichten FeSO₄ ein.

Daraus konnten wir schliessen, dass die normale Darmflora eine Bedingung für die Eisenresorption ist. In weiteren Versuchen kultivierten wir gegen Terramycin resistente Enterokokken und Kolibazillen. Nach Verabreichung solcher Kulturen an anämisierte Kaninchen, die die erwähnten Antibiotika erhielten, und ihrer weiterhin erfolgten Belastung mit FeSO₄, wurde das Eisen wieder resorbiert. Das spricht für die schon erwähnte Beobachtung, dass die normale Darmflora für die Eisenresorption notwendig ist.

Die Eisenbestimmung wurde nach der Methode HEILMEYER-PLÖTTNER ausgeführt¹.

Unsere weiteren Arbeiten befassen sich mit der Bedeutung der Darmflora für die Funktion des Apoferritins bzw. Ferritins.

Ein ausführlicher Bericht erscheint in den *Acta medica Jugoslavica*.

P. STERN, R. KOŠAK und
A. MISIRLIJA

Pharmakologisches Institut der Universität Sarajevo, den 17. Dezember 1953.

Summary

In rabbits whose intestinal tract has been "sterilised" by means of penicilline and terramycine, there is no detectable iron resorption, even when the animals are made anaemic.

Iron resorption can be restored by means of addition of terramycine-resistant *E. coli* or Enterococci to the diet.

¹ L. HEILMEYER, G. FISCHER und K. PLÖTTNER, *Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit*, Jena 1937, S. 8.

PRO EXPERIMENTIS

A Method of Mass Tissue Culture in Bacteriological Culture Dishes¹

The CARREL flask was devised to prevent microbial contamination of tissue cultures. Since antibiotics have come to be used routinely, those of its special features designed to minimize the risk of infection, have lost much of their importance. And because of limited accessibility to the culture space, and its relatively small size, the CARREL type of flask is inconvenient for the preparation of large scale cultures of cells such as are

¹ Aided by grants from the Masonic Foundation for Medical Research, Human Welfare and the U.S.P.H.S.

most useful as substrate for the propagation of viruses, or for the purposes of chemical analysis. EARLE's flask

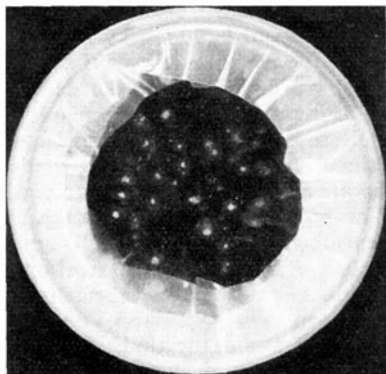


Fig. 1.—18 day old tissue cultures (chick) in PETRI dish 100 × 10 mm sealed with parafilm.

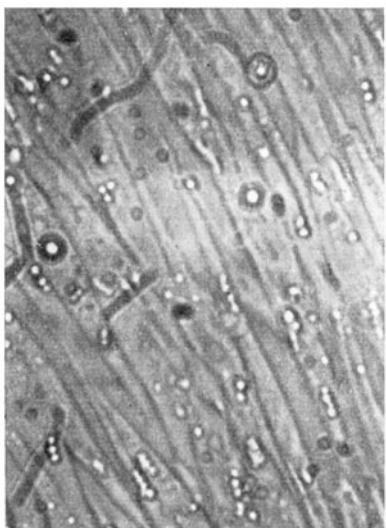


Fig. 2.—Chick embryo heart fibroblasts grown for 7 days in PETRI dish 150 × 10 mm. Magnification 400 ×.



Fig. 3.—10 day old tissue cultures growing in a PETROFF bacteriological culture dish, 100 × 10 mm.

#T-60¹ has increased size and improves microscopic visibility, but does not facilitate the accessibility to the culture space. An adaptation of culture dishes to simplify the MAXIMOW slide method by placing several coverslip cultures under a watch glass in a PETRI dish was suggested by BARTA². Culture dishes have also been used in organ-culture³. These techniques have little bearing on the problem of preparing mass cultures. ERLNMEYER flasks, ROUX bottles, and other vessels have been used for mass cultivation of cells, particularly for virology, but these do not readily permit direct microscopical observation of the cells. These disadvantages have largely been overcome by employing bacteriological culture dishes for mass tissue culture.

Methods. PETRI dishes 10 or 15 cm in diameter and 1 cm in height were used. The entire bottom of the dish was coated with a film of chicken plasma (2–5 ml depending upon dish size) and 5 to 8 tissue fragments, per square cm, were then explanted into the plasma. 3–5 ml of a medium consisting of 80% of chick amniotic fluid⁴ and 20% undiluted chick embryo extract and containing 250 units of potassium penicillin and/or 0.10 mg streptomycin per ml. were added before coagulation of the plasma. For human embryo tissue 15% of human placenta serum was added. The dish was closed by a 4–5 cm wide strip of parafilm or SCOTCH tape around the rim of the dish. The Syracuse culture dish was used in order to obviate the necessity for opening the culture dish by each refeeding, which can be done by insertion of a pipette into the single opening, kept sealed with parafilm at other times. (Models of dishes in which both halves are closely fitted together at their circumference without an annular air space between both halves have been suggested for fabrication.) PETRI dishes with flat-ground rims were also used, two upper or bottom halves being sealed with paraffin and then covered with parafilm or SCOTCH tape. Another bacteriological culture dish, the PETROFF dish, has also proved satisfactory, although accessibility and optical conditions are somewhat inferior to those of ordinary PETRI dishes. This dish is of one piece with an open sidearm that may be closed with parafilm or rubber stocking. The intervals between renewals of medium could safely be extended to 4–6 days, or even longer. Sometimes it appeared convenient to add plasma to the renewed medium to reduce the volume of free fluid.

For obtaining chicken amniotic fluid⁵, eggs of 8–12 days of incubation may be used. Under the visible part of the exposed allantoic membrane the amnion, a white avascular sac emerging between the receding allantois and yolk sac, is punctured and 2–4 ml of amniotic fluid is aspirated. Chick amniotic fluid suitable for tissue culture use must be water clear and colorless.

Results. The growth of cultures prepared in the manner described was luxurious. Over large areas many growth layers were superimposed upon one another, forming dense mats of cells. In general the floor of the dish was fairly covered with thick outgrowth in the third week. Microscopic observation of cells cultivated in PETRI dishes was possible up to 400 diameters. For subsequent microscopy with phase contrast, or for the fixing and staining of cultures, explants could be made on glass or mica coverslips affixed to the bottom of the dish with

¹ W. R. EARLE, V. J. EVANS, and E. L. SCHILLING, *J. Nat. Cancer Inst.* 10, 943 (1950).

² E. BARTA, *Arch. Exp. Zellforsch.* 4, 600 (1927).

³ H. B. FELL and R. G. CANTI, *Arch. Exp. Zellf.* 15, 311 (1934).

⁴ H. GROSSFELD, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 71, 475 (1949).

⁵ H. GROSSFELD, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 71, 475 (1949).

plasma. Among the tissues grown in culture dishes in chick amniotic fluid medium were chick heart fibroblasts, muscle, a variety of epithelia, glial cells, human embryonic skin and human embryonic heart fibroblasts. The exposure of explants and media to the open air was no greater in these than in other methods of tissue culture and the hazard of bacterial contamination proved to be negligible.

Amniotic fluid¹ was found to be an excellent basic constituent of culture media in these experiments. The large surface volume ratio obtaining at the air-fluid interphase assures excellent oxygenation. These factors, and the wide surface available for growth and migration may also be connected with the good growth obtained with longer periods between renewals of the medium.

The author is indebted to Dr. JOHN DECKER and to Dr. GABRIEL GODMAN for helpful suggestions.

H. GROSSFELD

From the Histochemistry Research Laboratory, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, N. Y., and the Edward Daniels Faulkner Arthritis Clinic of the Presbyterian Hospital, New York, December 8, 1953.

Zusammenfassung

Eine Methode der Massen-Gewebezüchtung in Petrischalen, geeignet für Viruszüchtung und für chemische Analysen, wird beschrieben, mit welcher, wenn ein gemeinsames, zusammenhängendes Plasmagerinnsel mit Zusatz von Embryonalextrakt und Amnionflüssigkeit als Züchtungsmedium benutzt wird. Ein besonders rasches, dichtes Kulturwachstum kann so leicht erzielt werden. Mikroskopische Beobachtung der Zellen ist bei 400facher Vergrößerung, im gewöhnlichen und im invertierten Mikroskop, leicht möglich.

¹ H. GROSSFELD, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 475 (1949).

PRO LABORATORIO

Le néphélégraphe

On utilise en statistique, dans ses applications à la biologie, à l'économétrie, à la démographie, etc., pour rechercher les corrélations entre deux caractéristiques numériques affectant les éléments d'une collection, un procédé de prospection qui consiste à marquer, dans un système d'axes cartésiens, pour chaque élément, un point ayant pour coordonnées les deux caractéristiques. On obtient ainsi un « nuage de points » ou néphélégramme. La disposition des points obtenus, leur alignement ou leur concentration, permettent parfois de tirer des conclusions sur les relations qui peuvent exister entre les caractéristiques considérées, ou de découvrir des groupes parmi les éléments, ou bien encore suggèrent des hypothèses plus ou moins fructueuses.

La confection à la main des néphélégrammes demande une attention soutenue et beaucoup de temps. Pour faciliter et accélérer ce travail il est raisonnable d'utiliser des appareils.

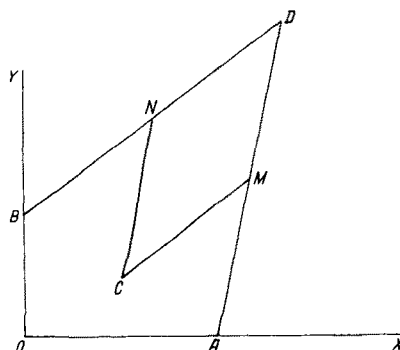
Le seul appareil proposé jusqu'à ce jour, d'après nos informations, consiste en deux règles, qui en se déplaçant restent (ou pour mieux dire, doivent rester) perpendiculaires aux axes. On les fixe sur les coordonnées choisies: il ne reste qu'à marquer un point au

croisement des deux règles. Cet appareil est peu pratique parce que, dans sa forme légère, la perpendicularité exacte est difficile à assurer d'une façon stable, et que, dans sa forme massive, qui permet plus d'exactitude, il est peu maniable. De plus, il est lent.

C'est pourquoi l'auteur a inventé une machine dans laquelle il suffit de mettre deux index, pouvant se déplacer le long de règles graduées, en face des valeurs numériques à inscrire, pour amener automatiquement sur une feuille de papier, à la place voulue, une pointe encreuse que l'on peut abaisser pour marquer un point sur le graphique.

Un tel appareil peut évidemment servir également à construire une courbe par points¹.

Cette machine a été réalisée très simplement au moyen d'un système articulé plan, formé de quatre tiges rigides AD , BD , MC , NC , telles que $AM = MD = MC = ND = CN = BN$ et articulées à leur point de rencontre. Le point A est astreint à se déplacer suivant OX et le point B suivant OY . Il est facile de se rendre compte que les coordonnées du point C , par rapport à ce système d'axes, sont respectivement égales à la moitié de l'abscisse de A et à la moitié de l'ordonnée de B .



Les points A et B sont matérialisées par des curseurs glissant le long de deux règles, graduées suivant les besoins et d'ailleurs interchangeables. Le point C est matérialisé par une pointe, garnie d'encre, qui vient au contact du papier au moyen d'un électro-aimant commandé par le jeu d'une manette ou d'une pédale, qui établit un contact.

Il n'y a aucun doute qu'un tel agencement est beaucoup plus parfait que celui mentionné plus haut. Il est plus léger et ce qui est encore plus important, il est très fidèle, attendu qu'il n'impose aucun angle invariable dans les pièces mobiles.

Cet appareil peut donc être utilisé avec profit dans les bureaux de statistique pour rechercher les corrélations et dans les laboratoires scientifiques pour construire commodément et rapidement des courbes par points.

P. J. A. MUFFANG

Conservatoire national des Arts et Métiers, Paris. Le 8 novembre 1953.

Summary

The author proposes an instrument for the simple and rapid calculation of the areas of points determined by two coordinates. Among many other applications, this apparatus can be used for finding correlations between two numerical characteristics in biology, or econometry, or demography, etc.

¹ Et inversement à relever, d'après un diagramme obtenu par un enregistreur automatique, un tableau de chiffres, pour rechercher par les méthodes mathématiques une fonction représentative.