

Records were also made of the responses in different nerves *ipsilateral* to the cortical region stimulated. The experiments showed that the CM systems for the nerves to the proximal arm muscles also have an ipsilateral cortical representation, whereas they indicate that this is not the case for the CM systems activating the nerves to the distal hand muscles in which only contralateral monosynaptic responses to cortical stimulation could be recorded.

In the investigations made by previous authors on the analysis of the corticospinal system in monkeys (see e.g. review by RUCH<sup>1</sup>), the movements or muscle contractions resulting from cortical stimulation were recorded. In our experiments the responses in different peripheral nerves to single cortical stimuli, as well as to each stimulus in a train of cortical shocks, were recorded. A single cortical shock elicits a descending volley in the fast conducting corticospinal neurones of the pyramidal tract<sup>2</sup>. In our experiments we found that single cortical shocks do not elicit any monosynaptic responses in the different fore limb nerves tested. Repetitive stimulation had to be used and during the course of stimulation the monosynaptic responses were built up in a regular way. It was shown that the repetitive cortical stimulation builds up a "tonic" asynchronous discharge and a long-lasting facilitatory action which successively raises the excitability of motoneurones; and further, that when the facilitatory action reaches a certain level, the monosynaptic responses to the descending volleys in the fast conducting CM fibres break through. In a series of experiments in which the conditioning effect of repetitive cortical stimulation on the monosynaptic reflex was tested, it was found that the cortical field, from which the facilitation of a certain group of spinal motoneurones was elicited, not only covered the restricted cortical field representing the CM system which activates the same group of motoneurones, but also exceeded it. It is of great interest to note that "the facilitatory area" and "the CM area" for the same group of spinal motoneurones have the same posterior border towards the postcentral gyrus, whereas the "facilitatory area" extends in the anterior direction (see BERNHARD and BOHM<sup>3</sup>).

C. G. BERNHARD and E. BOHM

*Physiological Department II, Karolinska Institutet,  
Stockholm, April 21, 1954.*

### Zusammenfassung

Es wurden Aktionspotentiale verschiedener Nerven registriert, welche auf jede kortikale Reizung in einem Zuge von repetitiven Stimulationen folgten, ferner wurden monosynaptische Reflexe nach konditionierenden kortikalen Stimulationen geprüft.

Die Experimente ergaben, dass unter den verschiedenen kortikospinalen Systemen das direkte kortikomotoneuronale System (das CM-System) die am meisten abgegrenzte kortikale Repräsentation besitzt.

<sup>1</sup> T. C. RUCH, *Handbook of Experimental Psychology*, chapt. 5, p. 154 (1951).

<sup>2</sup> C. G. BERNHARD, E. BOHM, and I. PETERSÉN, *Acta physiol. Scand.* 29, suppl. 106, 79 (1953).

<sup>3</sup> C. G. BERNHARD and E. BOHM, *Acta neurol. Psychiat., Chicago* 1954 (in press).

### PRO EXPERIMENTIS

### Die Isolierung eosinophiler Leukozyten und ihrer Granula

Frühere Versuche zur Gewinnung eosinophiler Zellen und Granula beruhten auf chemischen Methoden. WEISS<sup>1</sup> beschrieb schon 1891 die Resistenz der Granula gegen Fermentlösungen. Die Reindarstellung eosinophiler Granula aus Pferdeblut gelang PETRY<sup>2</sup> 1908 mittels Trypsin. NEUMANN<sup>3</sup> isolierte die Granula später unter Verwendung anderer lytischer Prozesse (NaOH, Autolyse) und stellte mit der gewonnenen Reinsubstanz umfangreiche physikalisch-chemische Untersuchungen an. In neuer Zeit hat VERCAUTEREN<sup>4</sup> eosinophile Granula auf rein physikalischem Weg dargestellt, indem er die Gesamtleukozyten in einem Homogenisatorapparat zertrümmerte und die freien Granula durch wiederholtes fraktioniertes Zentrifugieren gewann.

Eine von BEHRENS und TAUBERT<sup>5</sup> entwickelte Technik erlaubt nun erstmals, die einzelnen Leukozytenarten des Blutes auf Grund des spezifischen Gewichtes voneinander zu trennen. Es gelingt damit, aus Pferdeblut eine Suspension eosinophiler Granulozyten herzustellen. Somit steht uns ein sehr zweckmässiges Ausgangsmaterial zur relativ ergiebigen Gewinnung der eosinophilen Granula zur Verfügung. Wir verwenden folgende Arbeitsmethode:

*1. Isolierung eosinophiler Granulozyten.* Leukozyten werden gewaschen, entwässert und nach dem spezifischen Gewicht getrennt. Als Ausgangsmaterial dient Pferdeblut, das steril aus der Halsvene entnommen wird und durchschnittlich 3–5% Eosinophile enthält. 200 cm<sup>3</sup> 3,5%ige Na-Zitrat-Lösung werden mit 800 cm<sup>3</sup> Blut bei der Entnahme gut gemischt und in einer Standflasche stehengelassen, bis sich die Erythrozyten auf halbe Höhe der Flüssigkeitssäule gesenkt haben. Die erforderliche Zeit beträgt je nach Senkungsgeschwindigkeit des Blutes ½–2 h. Dann wird das überstehende, deutlich rotgefärbte Plasma abgehebelt. Es enthält neben Leukozyten noch massenhaft Erythrozyten. Die gewonnene Plasmamenge von etwa 500 cm<sup>3</sup> wird in Portionen zu 100–150 cm<sup>3</sup> 4 min lang bei einer Tourenzahl von 1700/min zentrifugiert (Zentrifuge Stock, Marburg). Das Sediment wird vereinigt und in 30 cm<sup>3</sup> 1%iger NaCl-Lösung aufgeschüttelt. Durch die etwas hypertonische Salzlösung kommt es zu einer leichten Schrumpfung der Erythrozyten und der neutrophilen Granulozyten, während die eosinophilen Zellen ihr Volumen kaum verändern. Bei den Eosinophilen des Pferdes handelt es sich ohnehin um relativ grosse Zellen, und der Unterschied in der Zellgrösse lässt sich so noch akzentuieren.

Die Zellen werden wiederum während 4 min bei einer Tourenzahl von 1700/min zu Boden zentrifugiert. Das Sediment wird zehnmal gewaschen, jedesmal in 30 cm<sup>3</sup> 1%iger NaCl-Lösung kräftig aufgeschüttelt und kurz zentrifugiert (2½ min bei 1700 T.). Dadurch lässt sich nicht nur das Plasmaeiweiss weitgehend eliminieren,

<sup>1</sup> A. WEISS, *Zbl. med. Wiss.* 29, 881 (1891).

<sup>2</sup> E. PETRY, *Wien. klin. Wschr.* 21, 1360 (1908); *Biochem. Z.* 18, 92 (1912).

<sup>3</sup> A. NEUMANN, *Biochem. Z.* 148, 524 (1924); 150, 256 (1924); *Fol. haematolog.* 36, 95 (1928); *Hdb. allg. Haematol.* 1, 354 (1932, Urban & Schwarzenberg).

<sup>4</sup> R. VERCAUTEREN, *Enzymologia* 16, 1 (1953).

<sup>5</sup> M. BEHRENS und M. TAUBERT, *Hoppe Seyler Z. physiol. Chem.* 289, 63 (1952); 290, 228 (1953).

sondern es werden mit der Waschflüssigkeit auch die im Sediment noch vorhandenen Erythrozyten und ein Teil der Leukozyten entfernt. Das anfänglich rote Sediment wird weiss und besteht schliesslich fast nur noch aus Granulozyten, wobei auch die Eosinophilen bereits deutlich angereichert sind. Nach dem Waschen werden die Zellen entwässert. Das Sediment wird in 50 cm<sup>3</sup> 1%iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt, unter kräftigem Umschütteln mit 250 cm<sup>3</sup> Azeton versetzt und etwa 1 h stehengelassen. Nach erneutem Zentrifugieren (2 min 1700 T.) werden die Zellen einmal in 30 cm<sup>3</sup> 95%igem Azeton (95 T. Azeton, 5 T. Aqua dest.) und viermal in 30 cm<sup>3</sup> reinem Azeton gewaschen. Das Sediment ist jetzt entwässert; die Zellen sind aber grösstenteils miteinander verklumpt.

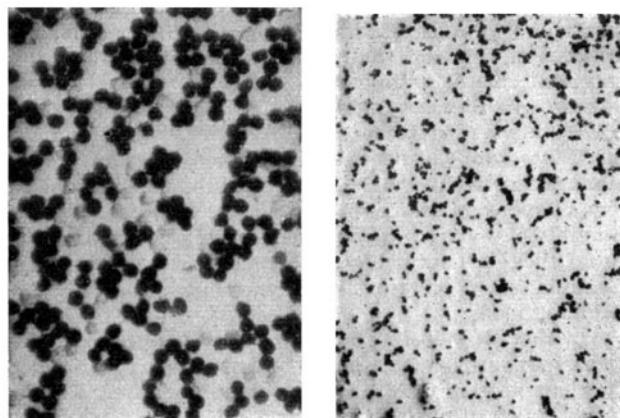


Abb. 1 (links). Zellanreicherung aus Pferdeblut. Schwarze Zellen = Eosinophile (Ausstrichpräparat, Färbung May-Grünwald, Vergrösserung 560 ×). — Abb. 2 (rechts). Eosinophile Granula des Pferdes (Ausstrichpräparat, Färbung May-Grünwald, Vergrösserung 560 ×).

Das Leukozytensediment wird mit 10 cm<sup>3</sup> Tetrachlorkohlenstoff und 3 g pulverisiertem, wasserfreiem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt und in einer Schüttelmaschine so lange und so intensiv geschüttelt, bis die Zellverklebungen gelöst sind (½–2 h), ohne dass die Zellen wesentlich lädiert werden. Da die Leukozyten spezifisch leichter sind als Tetrachlorkohlenstoff, bleiben sie nach dem Schütteln in Suspension, während das schwerere Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> rasch sedimentiert. Die suspendierten neutrophilen und eosinophilen Granulozyten lassen sich jetzt auf Grund des spezifischen Gewichtes voneinander trennen. Dazu werden durch verschiedenes Mischungsverhältnis aus Tetrachlorkohlenstoff und Petroläther Lösungen vom spezifischen Gewicht 1,25; 1,30; 1,325; 1,35; 1,40 hergestellt. Allen Mischungen wird eine Spur Lezithin beigegeben, gerade so viel, bis eine kaum sichtbare gelbliche Tinktion erreicht wird. Erfahrungsgemäss kann dadurch in der Folge ein erneutes Verklumpen der Leukozyten vermieden werden.

Als Trennungsflüssigkeiten hält man sich die laut Tabelle lezithinhaltigen Tetrachlorkohlenstoff-Petroläther-Mischungen vorrätig.

Die Mischungen werden in einem 100 cm<sup>3</sup>-Messzyylinder hergestellt. Für das Schichtverfahren reicht die so erzielte Genauigkeit aus.

In einem Zentrifugenrohr von 1 bis 1½ cm Weite und 10 cm Länge werden nun etwa 2 cm<sup>3</sup> der Leukozytensuspension mit einer Flüssigkeitssäule von fallendem spezifischem Gewicht überschichtet. Die Übergänge des spezifischen Gewichtes müssen möglichst fliessend sein, was am besten mit folgender Technik erreicht wird: Um eine bessere Durchmischung zu gewährleisten, wird beim Überschichten jeder Portion noch eine kleine Menge des Gemisches mit dem nächst höhern spezifischen Gewicht nachgegossen, so dass sich beim Einfüllen folgende Reihenfolge ergibt: zuunterst 2 cm<sup>3</sup> Leukozytensuspension, dann etwa 1,5 cm<sup>3</sup> s 1,4; etwa 1,5 cm<sup>3</sup> s 1,35; etwa 0,5 cm<sup>3</sup> s 1,4; etwa 1,5 cm<sup>3</sup> s 1,33; etwa 0,5 cm<sup>3</sup> s 1,35; etwa 1,5 cm<sup>3</sup> s 1,30; etwa 0,5 cm<sup>3</sup> s 1,33; etwa 1,5 cm<sup>3</sup> s 1,25; etwa 0,5 cm<sup>3</sup> s 1,30; zuoberst etwas Petroläther. Nun wird mit einem dünnen Metalldraht horizontal ziemlich kräftig umgerührt, so dass durch eine gewisse Vermischung ein fliessender Übergang s 1,4–s 1,25 entsteht. Dann wird das Röhrchen verkorkt und 5 min bei einer Tourenzahl von 3000/min zentrifugiert. Die Zellen stellen sich dabei nach ihrem spezifischen Gewicht in einer entsprechenden Schichthöhe ein, wobei das spezifische Gewicht der Eosinophilen um 1,33 liegt. Die Fraktion der Eosinophilen ist meist an einem leicht gelblichen Farbtön zu erkennen und liegt direkt oberhalb der Neutrophilen. Die Eosinophilen müssen sehr sorgfältig mittels einer fein ausgezogenen, rund 2 cm<sup>3</sup> fassenden Pipette und einer mechanischen Abzugsvorrichtung herauspipettiert werden<sup>1</sup>.

Ist der Reinheitsgrad noch nicht genügend, werden die Zellen nach Zugabe von Petroläther zu Boden zentrifugiert und demselben Schichtungsverfahren erneut unterworfen, bis eine Zellsuspension gewonnen wird, die zu 80–100% aus Eosinophilen besteht. Die Zellen sind bei sorgfältigem Arbeiten morphologisch intakt, zeigen unveränderte Färbbarkeit und sind in fixiertem Zustand sehr lange haltbar. Durch Überführen in den rasch verdunstenden Petroläther lassen sie sich trocknen und als weisses Pulver gewinnen.

2. *Gewinnung eosinphiler Granula.* Werden die Zellen in Tetrachlorkohlenstoff und Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf die oben beschriebene Art in der Schüttelmaschine behandelt, so können die Zellmembranen leicht zerstört und die eosinophilen Granula in Suspension gebracht werden, sofern intensiver und länger geschüttelt wird. Je nach der Apparatur sind dazu 8–12 h notwendig. Die Granula werden danach durch das angegebene Schichtungsverfahren isoliert. Es gelingt, aus 800 cm<sup>3</sup> Pferdeblut rund 50 mg Trockensubstanz an eosinophilen Granula zu gewinnen.

M. BEHRENS und H. R. MARTI

*Physiologisches Institut der Medizinischen Akademie der Justus-Liebig-Hochschule, Giessen, und Medizinische Universitätsklinik, Zürich, den 2. März 1954.*

#### Summary

A method is described for isolation of eosinophile leucocytes and their granula. The separation from the other cellular elements of blood is based on the differential specific weight.

<sup>1</sup> Pipettierzubehör und Schüttelmaschine sind durch die Firma Otto Kobe, Marburg an der Lahn, zu beziehen.

Mischung von spezifischem Gewicht	cm <sup>3</sup> Tetrachlorkohlenstoff	cm <sup>3</sup> Petroläther
1,4	80	20
1,35	77,5	22,5
1,325	72,5	27,5
1,30	70	30
1,25	65	35