



Fig. 1. ERG chez le lapin avant et après injection intraveineuse d'insuline.

dans ce cas intervienne un collapsus circulatoire qui ajoute son effet à celui de l'hypoglycémie. Chez les animaux qui ont surmonté leur hypoglycémie et chez lesquels, pour compenser un collapsus circulatoire éventuel, une injection de coramine a été faite, celle-ci n'a exercé aucune action sur l'ERG.

Conclusions. L'action de l'insuline montre clairement que l'activité bioélectrique normale de la rétine est en corrélation étroite avec le taux de la glycémie. Un autre fait est à relever: c'est l'importance des réserves énergétiques de la rétine, qui sont tout d'abord épuisées avant que l'action de l'hypoglycémie sur l'ERG se manifeste. Le décalage dans le temps entre le minimum de la glycémie et le minimum de l'onde *b* s'explique par le fait que les réserves de glycogène rétinien permettent tout d'abord de compenser l'insuffisance d'apport de glucose. Après épuisement des réserves, l'onde *b* s'abaisse rapidement. Leur reconstitution permet à l'activité électrique normale de la rétine de se manifester à nouveau.

Par des moyens un peu différents, en combinant les effets de l'anoxie et de l'hypoglycémie, PABST² est parvenu récemment aux mêmes conclusions concernant l'importance du maintien du taux normal de la glycémie pour la conservation de l'activité bioélectrique normale de la rétine ainsi que du cerveau du lapin.

J. BABEL et B. ZIV

Clinique Ophthalmologique de l'Université de Genève, le 21 août 1956.

Summary

Hypoglycaemia in the rabbit due to an intravenous injection of insulin results in an important diminution of the value of the *b* wave in the ERG (up till 80%). Nevertheless, this phenomenon does not follow directly upon the lowering of the blood glucose level but takes place, on the average, about 2 h later. This fact is explained by the enormous energy reserves of the retina, the lowering of the ERG taking place only when these reserves are exhausted.

² W. PABST, Graefes Arch. 187, 122 (1955).

PRO EXPERIMENTIS

An Optically Clear Egg-yolk Diluent for Bull-Spermatozoa¹

All investigations with optical means about the motility or the movements of spermatozoa are complicated by the difficulties of securing the right diluent. The egg-yolk-citrate diluent, which has proved since 1939 to be excellent in preserving motility during cooling and storing, is not suitable for use in optical measurements, because it is not clear. The simple citrate or phosphate buffers (without the addition of egg-yolk) are sufficiently clear, but they often give bad motility after dilution and cooling, and results can not be repeated.

In the course of an investigation about the movements of spermatozoa with optical devices, we came across that problem also in our Institute. Some experiments showed, however, that it was possible to clear a 15–20% egg-yolk-citrate buffer while maintaining its protecting properties. The procedure was as follows: first centrifugating for 1 h at 150,000 g in a Sphincto preparative ultracentrifuge. The emulsion of the egg-yolk then floated and could be removed with a Pasteurian pipette. The remaining fluid (about 80%) was now fairly clear. Further clearing was obtained by filtering in successive stages through membrane filters. The filters used were a Schleicher & Schull 1121 (pore width ca. 1 μ) followed by M.G.S. 'mittel 6' (ca. 500 m μ) and finally by M.G.S. 'fein 9' (ca. 250 m μ).

After this process, a clear yellow solution remained, although it still showed a weak Raleigh scattering. In carrying out the desired measurements this can however be eliminated by means of a yellow glassfilter.

The diluent thus obtained showed a very satisfactory protective action after dilution and cooling. Electrophoretic analyses of the diluter gave no remarkable differences in content of lipoproteins (which are probably responsible for the protective action (KAMPFSCHEIMIT²), between the treated and non-treated solution. The results of an estimation of the N and P content of a treated 15% egg-yolk diluent were: N = 0.38% and P =

¹ 98th Publication of the Research Institute for Animal Husbandry T.N.O., Utrecht, Netherlands.

² R. F. KAMPFSCHEIMIT, D. T. MAYER, and H. A. HERMAN, J. Dairy Sci. 36, 733 (1953).

0.04%; for the non-treated sample: N = 0.50% and P = 0.05%.

When sealed in glass ampoules and stored at 4°C, the diluter could be used for about 3 weeks.

Our thanks are due to Dr. J. DE WAEL from the Laboratory for Veterinary Biochemistry, University of Utrecht, for advice and for the supervision of the electro-phoretical analysis.

R. RIKMENPOEL

Research Institute for Animal Husbandry T.N.O., Utrecht, October 25, 1956.

Zusammenfassung

Es wird eine Arbeitsmethode beschrieben zur Klärung einer isotonischen Zitratlösung mit 15% Eidotter: 1. Zentrifugieren in einer Ultra-Zentrifuge während einer Stunde bei 150 000 g; 2. Filtrieren durch Membranfilter in aufeinanderfolgenden Schritten.

PRO EXPERIMENTIS

Anwendung einer Silikonschicht zur leichteren Ablösung von Gewebskulturen bei Methacrylat-Einbettung

Für die Plasteinbettung von Gewebskulturen zur Herstellung von Schnitten in der Elektronenmikroskopie sind verschiedene Methoden beschrieben worden (BORYSKO und SAPRANAUSKAS¹, PALADE und PORTER²).

Die im folgenden beschriebene Methode erleichtert das Ablösen der plasteingegebeneten Kulturen von den Gläsern, indem auf Deckgläsern oder in «Roller-tubes», die mit einer dünnen Silikonschicht ausgekleidet sind, gezüchtet wird. Die Glasflächen werden mit Äther entfettet und danach mit Bichromatschwefelsäure gereinigt. Nach sorgfältigem Abspülen in destilliertem Wasser und Trocknen werden sie mit einer Silikonlösung³ bestrichen, welche in Wasser, Alkohol und *n*-Butylmethacrylat unlöslich sein muss. Weiterhin ist für die trockene Sterilisation eine Wärmebeständigkeit bis 160°C erforderlich.

Ein kleiner Tropfen Silikonlösung wird mit einem Glasstab auf die zu behandelnde Fläche aufgebracht. Mit einem Wildlederläppchen wird er so über das Glas verteilt, dass dieses zum Schluss mit einer dünnen Silikonschicht überzogen ist. Die richtige Dicke des Silikons ist erreicht, wenn ein von der Oberfläche abgesaugter Wassertropfen noch eine dünne Wasserschicht zurücklässt.

Gewebszüchtung auf Deckgläsern nach der Methode des «liegenden Tropfens»: Nach erfolgter Zellproliferation werden die Kulturen mit einer 1%igen OsO₄-Lösung fixiert. Danach werden die Präparate mit Wasser abgespült, in 70%igem, 90%igem und absolutem Alkohol entwässert und schliesslich mit *n*-Butylmethacrylat⁴

imprägniert. Die Einbettung in Plast mit Katalysator wird in silikonbehandelten Lochgläsern vorgenommen. Nach Polymerisation bei 45°C werden die Deckgläser mit einer dünnen Rasierklinge vom Plast gelöst. Falls Schwierigkeiten auftreten, werden die Präparate für einige Minuten abgekühlt⁵.

Gewebszüchtung in silikonbehandelten «Roller-tubes»: Die ausgewachsenen Kulturen werden fixiert, entwässert und in den Rohren eingebettet. Nach der Polymerisation werden diese zerschlagen und das Plast mit den eingebetteten Kulturen vom Glas gelöst, worauf die Präparate geschnitten werden können.

Untersuchung von Herzfibroblasten 7 Tage alter Hühnerembryonen mit dem Phasenkontrastmikroskop ergab, dass die Proliferation in Kulturen auf Deckgläsern mit und ohne Silikonbehandlung gleich gut erfolgte. Eine toxische Wirkung der Silikonschicht war nicht festzustellen. Zwischen Zellen, die auf silikonbehandelten, und solchen, die auf unbehandelten Gläsern gewachsen waren, konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Weitere Untersuchungen über eine mögliche Beeinflussung der Zellen durch die Silikonschicht sind noch im Gange⁶.

K. E. HELLSTRÖM und O. NILSSON

Histologische Abteilung des Karolinska Institutes, Stockholm, Schweden, den 15. September 1956.

Summary

The method proposed can be used for plast embedding of cover-slip and roller-tube cultures. The glass surface is coated with a thin silicone film to facilitate the removal of the plast. The silicone does not seem to disturb the growing cells.

⁵ K. E. HELLSTRÖM, in Vorbereitung.

Atmungshemmung und Karzinogenese

Nach Versuchen von NIEPER und DRUCKREY¹ gelingt es bei Ratten nicht, mit Janusgrün Krebs zu erzeugen, obwohl doch, wie die Autoren hervorheben, Janusgrün die Atmung hemmt. In diesem Zusammenhang möchte ich darauf hinweisen, dass nicht jede Atmungshemmung karzinogen ist, wie das Beispiel der Blausäure lehrt. Karzinogen ist eine Atmungshemmung nur dann, wenn die Atmungshemmung nach Entfernung der atmungshemmenden Substanz bestehen bleibt; wenn die Atmungshemmung auch bei allen folgenden Zellteilungen bestehen bleibt; wenn die atmungshemmende Substanz die Gärung nicht hemmt; und wenn die atmungshemmende Substanz die Zellteilung nicht hemmt. Der Erfahrungssatz (von dem es keine Ausnahme gibt) «keine Krebszelle ohne geschädigte Atmung» darf also nicht umgekehrt werden in den Satz «keine Atmungshemmung ohne Krebsentstehung». Glücklicherweise gibt es sehr viele Hemmungen und Schädigungen der Atmung, die nicht karzinogen sind.

O. WARBURG

Max-Planck-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem, den 2. Februar 1957.

¹ B. BORYSKO und P. SAPRANAUSKAS, Bull. Johns Hopkins Hosp. 95, 68 (1954).

² G. E. PALADE und K. R. PORTER, J. exper. Med. 100, 641 (1954).

³ DRI-FILM 9987, General Electric Company, New York.

⁴ S. B. NEWMAN, E. BORYSKO und M. SWERDLOW, J. appl. Phys. 22, 114 (1951).

⁵ Exper. 13, 40 (1957).